

Université de Sherbrooke

Recombinaison chez un réplicon eucaryote:
implication d'éléments régulateurs de la transcription

par

Chantal Nault

Thèse présentée à la Faculté de
médecine en vue de l'obtention
du grade de Docteur ès Sciences (Ph.D.)

Mai 1995



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services Branch

395 Wellington Street
Ottawa, Ontario
K1A 0N4

Bibliothèque nationale
du Canada

Direction des acquisitions et
des services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa (Ontario)
K1A 0N4

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

ISBN 0-612-09501-0

Canada

TABLE DES MATIERES

	page
TABLE DES MATIERES	I
LISTE DES ILLUSTRATIONS	IV
LISTE DES ABREVIATIONS	VI
RESUME	VII

INTRODUCTION

A) Préambule	1
B) Modèle RmI	3
C) Conversion de RmI en P155: recombinaison site-spécifique ou homologue	7
D) Recombinaison et transcription	8
E) Région intergénique de Py	13
1. organisation physique	13
2. régulation de la transcription	17

MATERIEL ET METHODES

A) Clonage moléculaire dans <i>E. coli</i>	20
1. bactéries et vecteur plasmidique	20
2. enzyme de restriction et électrophorèse	20
3. purification sur gel préparatif et élution	20
4. ligation	21
5. déphosphorylation des vecteurs plasmidiques	21
6. transformation bactérienne et sélection	21
7. amplification et purification des plasmides	21
8. amplification de l'ADN <i>in vitro</i> par PCR	22
B) Essai de répllication-recombinaison	23
1. cellules	23
2. préparation de l'ADN plasmidique	23
3. transfection au DEAE-dextran	23
4. extraction de l'ADN de faible P.M.	24
5. buvardage	24
6. préhybridation, hybridation et lavages	25
7. marquage de l'ADN <i>in vitro</i>	25

C) Extraction d'ARN et préparation pour le RT-PCR .	26
D) RT-PCR	27
1. transcription inverse de l'ARN	27
2. PCR	27
3. liste des amorces utilisées lors des réactions RT-PCR	28

CONSTRUCTION DES ADN PLASMIDIQUES

A) Mutants précoces de RmI	30
B) Mutants tardifs de RmI	32
C) Molécules O(5022)/pRmI et O(4633)/pRmI	32
1. construction de O(5022)/pRmI	32
2. construction de O(4633)/pRmI	33
D) Dérivés de O(4633,+)/pRmI: Δ O2 et DM	33
1. construction de Δ O2	33
2. construction de DM	34
E) Liste des amorces employées	34

TABLEAU RECAPITULATIF DES MOLECULES UTILISEES	37
---	----

RESULTATS

A) Mutants précoces de RmI: transfection des cellules 3T6 et scop-T1	40
B) Mutants tardifs de RmI: transfection des cellules 3T6 et scop-T1	44
C) Co-transfection des cellules 3T6 avec les mutants précoces et l'ADN sauvage de Py	45
1. co-transfection des 3T6 avec RmI et pPB21 .	47
2. co-transfection des 3T6 avec Δ BT et pPB21 .	47
3. co-transfection des 3T6 avec Δ Pe et pPB21 .	50
4. RmI et Δ BT: comparaison des traitements XbaI et SmaI/ClaI	52
5. redigestion des échantillons Δ BT + pPB21 avec SmaI et ClaI	54

D) Co-transfection des 3T6: production de génomes viraux de longueur unitaire	56
E) Recombinaison chez RmI: processus conservatif ou non conservatif	59
1. transfection avec O(5022,-)/RmI: la SR donne le produit T, parfois le produit B . . .	60
2. transfection avec O(4633,+)/RmI: la LR et la SR génèrent des quantités équivalentes des deux produits de recombinaison	63
3. une molécule mutante avec une O2 défectueuse donne les deux produits de la LR	65
4. la LR, un processus non conservatif	68
F) Relation entre la transcription et la recombinaison SR	71
1. Σ Tbis: construction et transfection	72
G) Analyse des ARN chez RmI et ses dérivés	75
1. étude de la transcription précoce chez RmI et ses dérivés	76
2. étude de la transcription tardive chez RmI et ses dérivés	80
3. analyse des ADN 3 jours après transfection	82

DISCUSSION

A) Analyse de la SR chez RmI et ses mutants	86
B) Transcription des répétitions S chez RmI et ses mutants	90
C) Co-transfection des 3T6: production efficace d'ADN viral de longueur unitaire	92
D) La SR et la LR chez les molécules à deux régions intergéniques	94
1. la SR	94
2. la LR	95
E) Conclusion	97

REMERCIEMENTS	98
-------------------------	----

BIBLIOGRAPHIE	99
-------------------------	----

LISTE DES ILLUSTRATIONS

	Page
FIGURE 1: Organisation fonctionnelle du génome Py	4
FIGURE 2: Carte physique de RmI et du produit de recombinaison P155	6
FIGURE 3: Eléments régulateurs entourant l'origine de Py	14
FIGURE 4: Introduction de mutations précoces dans RmI	29
FIGURE 5: Effets des délétions du Pe sur la recombinaison entre les répétitions S après transfection des cellules 3T6 et <i>scop</i> -T1	42
FIGURE 6: Influence de l'orientation du PI sur la recombinaison entre les répétitions S	46
FIGURE 7: Co-transfection des 3T6 avec RmI et pPB21	48
FIGURE 8: Co-transfection des 3T6 avec Δ BT et pPB21	49
FIGURE 9: Co-transfection des 3T6 avec Δ Pe et pPB21	51
FIGURE 10: Co-transfection des 3T6 avec RmI + pPB21 et Δ BT + pPB21: comparaison des traitements XbaI et SmaI/ClaI	53
FIGURE 11: Co-transfection des 3T6 avec Δ BT et pPB21	55
FIGURE 12: Effet de la position du site de clonage sur la production d'ADN viral de longueur unitaire dans les expériences de co-transfection	57
FIGURE 13: Carte physique de O(5022,+)/RmI et O(4633,+)/RmI	61
FIGURE 14: Recombinaison chez RmI et O(5022,-)/RmI	62
FIGURE 15: Recombinaison chez O(4633,+)/RmI et son mutant Δ O2	64
FIGURE 16: Fonctionnalité des origines de réplication chez les mutants de la série O/RmI	67
FIGURE 17: Recombinaison chez le double mutant DM	70

FIGURE 18: Réplication et recombinaison de ΣT et ΣT_{bis}	74
FIGURE 19: RT-PCR/CI et RT-PCR/JP sur RmI et ses dérivés	77
FIGURE 20: RT-PCR/JP et RT-PCR/JT sur RmI et ses dérivés	81
TABLERAU I: Rapports JT/JP pour RmI et ses dérivés	83
FIGURE 21: Essai de réplication-recombinaison pour 3 jours de transfection . . .	85
FIGURE 22: Recombinaison intermoléculaire entre pPB21 et RmI ou un de ses dérivés	93

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN: acide déoxyribonucléique

AMV: avian myeloblastosis virus

CsCl: chlorure de césium

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium

EDTA: éthylènediamine tétraacétate

kb: kilobases

kd: kilodaltons

MMTV: mouse mammary tumor virus

nt: nucléotide

SDS: sodium dodécyl sulfate

pb: paire de bases

PCR: polymerase chain reaction

P.M.: poids moléculaire

Py: polyome

RT: réverse transcription

SV40: virus simien 40

ts: thermosensible

SR: recombinaison entre les répétitions S

LR: recombinaison entre les grandes homologies

RESUME

La recombinaison homologue a été étudiée dans la cellule de souris à l'aide du modèle RmI. RmI est une molécule d'ADN circulaire hybride Py/souris, comportant 1,03 copie du génome Py et une insertion (Ins) de 1628 pb d'ADN de souris. De part et d'autre de Ins, on retrouve une répétition virale directe de 182 pb, appelée répétition S. RmI, lorsque transfecté dans des cellules de souris, se convertit très efficacement en ADN Py de longueur unitaire par recombinaison entre les répétitions S (recombinaison S ou SR).

La transfection de mutants de RmI, ayant une délétion ou une substitution de certains éléments régulateurs de la transcription précoce, comme la boîte TATA, a mis en évidence une relation étroite entre la capacité des molécules à se répliquer dans les 3T6 - donc à exprimer les protéines précoces - et leur capacité à recombiner. Nous avons donc proposé un modèle où la recombinaison SR est dépendante de la transcription précoce chez RmI. Toutefois, la transfection de mutants de RmI, handicapés au niveau de la transcription tardive et affectés également au niveau de la recombinaison, nous a amenés à modifier notre modèle, en ce sens où la recombinaison SR, chez RmI, semble influencée par les transcriptions virales précoce et tardive.

L'implication d'éléments régulateurs de la transcription a également été mise en évidence chez des réplicons dérivés de RmI portant non pas une, mais deux régions intergéniques régulatrices des transcriptions précoce et tardive, la seconde région étant introduite au niveau de l'Ins. La transfection de ces molécules a permis de mettre en

évidence deux types d'événements: la recombinaison SR, ayant lieu entre les deux répétitions S, et la recombinaison LR, ayant lieu entre les deux régions intergéniques. En ce qui concerne la SR, la détection de certains produits de recombinaison semble associée à la présence d'une séquence ayant un effet stimulateur sur la transcription tardive (fragment BamHI-BclI). De même, pour la LR, l'intégrité du promoteur tardif semble affecter la nature des produits générés par recombinaison.

Enfin, l'analyse directe des transcrits chez des dérivés de RmI n'a pas permis de mettre en évidence un lien flagrant entre transcription et recombinaison. En effet, des mutants précoces de RmI, ayant apparemment une transcription précoce et une transcription tardive normales, ne recombinent pas ou recombinent très peu par rapport à la molécule sauvage. Toutefois, la méthode utilisée pour analyser la transcription des molécules, le RT-PCR, est une technique **qualitative** qui ne peut vérifier tous les aspects du processus transcriptionnel.

Le travail présenté ici a éclairci deux points: 1) mise en évidence d'une dépendance de la recombinaison envers certains éléments régulateurs de la transcription; 2) démonstration de l'absence d'un lien direct entre recombinaison et processivité de la transcription. De plus, des expériences de co-transfection, visant en premier lieu à étudier l'implication de la protéine virale précoce grand T (LT) dans la recombinaison, ont permis de mettre en évidence un phénomène de recombinaison intermoléculaire nouveau, menant à la production d'ADN viral de longueur unitaire à partir d'un recombinant plasmidique.

INTRODUCTION

A) Préambule

La recombinaison génétique est un processus moléculaire qui génère de nouveaux arrangements chez le matériel génétique. Le fait que ce processus soit présent chez tous les êtres vivants, des procaryotes aux eucaryotes les plus complexes, est un indice de son importance biologique. La réparation de l'ADN endommagé, la formation du complexe synaptonemal des chromosomes lors de la méiose chez les eucaryotes, l'activation d'oncogènes et la perte de gènes suppresseurs de tumeurs sont tous des événements impliquant un mécanisme de recombinaison génétique. Comprendre ce processus moléculaire revêt donc une importance particulière.

Il est admis depuis déjà un certain temps que la recombinaison génétique englobe quatre types de réarrangements: la recombinaison homologue, la recombinaison site-spécifique, la recombinaison illégitime et la transposition. La recombinaison homologue fait référence à un réarrangement impliquant deux séquences d'ADN identiques ou presque (20 pb semblent suffisantes chez *E. coli*; Watt *et al.*, 1985). L'efficacité de la recombinaison est en général proportionnelle à l'importance de l'homologie. De plus, le point de "crossing-over" est distribué au hasard. L'événement site-spécifique fait plutôt intervenir deux ADNs partageant peu ou pas d'homologie. Ce type de recombinaison implique une ou plusieurs protéines spécialisées non impliquées dans la recombinaison homologue. Contrairement à cette dernière, elle a lieu à des sites spécifiques. La recombinaison illégitime fait référence à tous les événements n'appartenant ni à la

recombinaison homologue, ni à la recombinaison site-spécifique. Les événements illégitimes représentent la majorité des événements ayant lieu chez la cellule de mammifère, et est plus fréquente chez cette dernière que chez la cellule procaryote (Kucherlapati et Smith, 1988). Enfin, la transposition est un processus où des séquences d'ADN sont déplacées d'un endroit à un autre dans le génome. Les éléments transposables, les rétrotransposons et les rétrogènes sont trois types d'éléments mobiles se déplaçant par transposition. Une caractéristique bien établie de la transposition est la duplication d'une courte séquence de part et d'autre de l'élément mobile, au niveau du site d'insertion (Singer et Berg, 1991).

Ces modes de recombinaison sont étudiés à l'aide de modèles, autant chez les procaryotes que chez les eucaryotes (levures, plantes et mammifères). Certains modèles reposent sur l'étude de la recombinaison intrachromosomique, où les séquences recombinogènes font partie du matériel génétique de l'hôte, et d'autres reposent sur l'étude de la recombinaison extrachromosomique, où les séquences recombinogènes font partie d'un épisome. Chaque système a ses avantages et ses inconvénients. Par exemple, les études basées sur des substrats intégrés sont en général compliquées, du fait que les événements de recombinaison, souvent faibles en nombre (un par cellule), sont difficiles à détecter. Ce problème ne se rencontre pas avec les substrats épisomiques (plusieurs substrats, donc plusieurs événements par cellule). Avec les substrats intégrés, les conditions d'étude sont "naturelles". Toutefois, les résultats peuvent être influencés par les séquences flanquantes, problème complètement évité par l'utilisation d'épisomes (Kucherlapati et Smith, 1988).

Dans le laboratoire du Dr Bourgaux, la recombinaison homologue est étudiée dans la cellule de souris à l'aide d'un substrat épisomique nommé RmI.

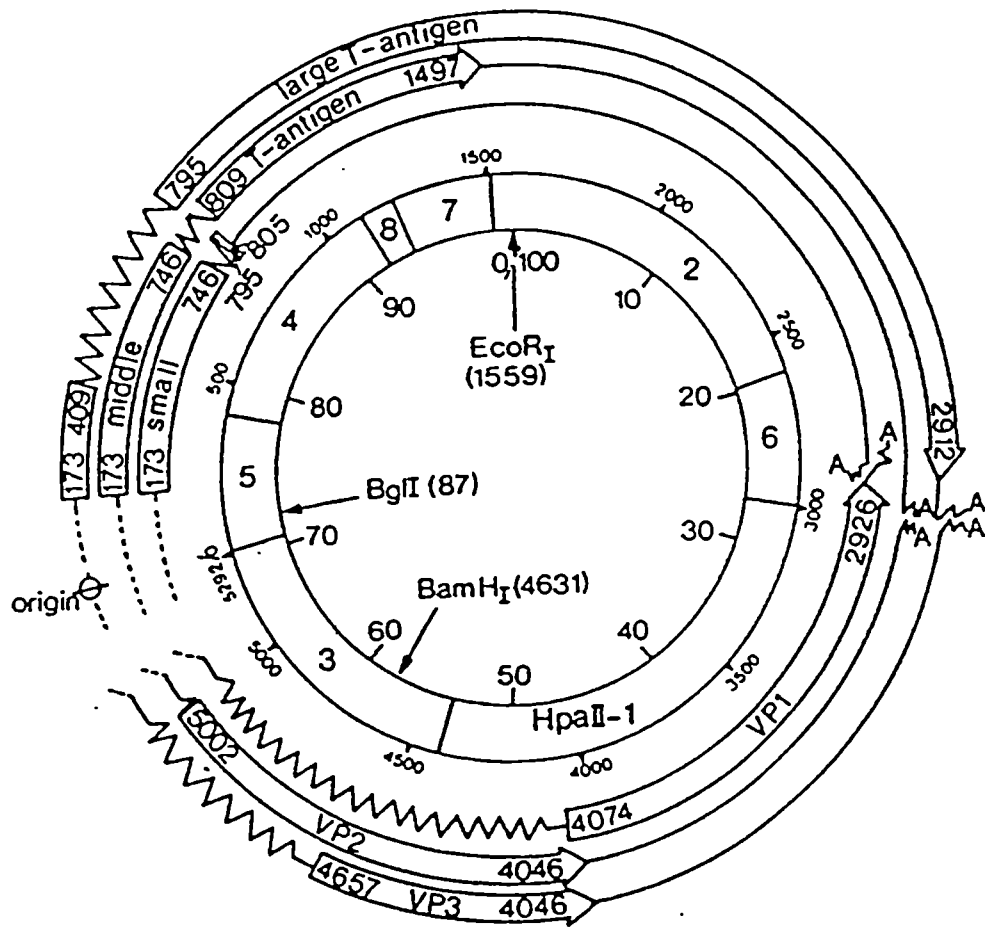
B) Modèle RmI

RmI est une molécule d'ADN circulaire hybride Py/souris, produite par recombinaison site-spécifique dans des cellules Cyp transférées de 39°C à 33°C. La lignée Cyp (Bourgaux *et al.*, 1978) résulte de la transformation d'une culture secondaire d'embryons de souris à la température restrictive de 39°C par un mutant thermosensible du virus Py, *ts*P155 (Eckhart, 1969) ou plus simplement P155. Le mutant P155, isolé à partir de la souche sauvage P16 (Diamond et Crawford, 1964), code pour une protéine grand T (LT) *ts*, mutation résultant d'une transversion G→C au nt 2658 (Gendron *et al.*, 1988), et délétée de 12 pb, soit des nt 1348 à 1359 (Galup *et al.*, 1984; Gélinas *et al.*, 1982). Cette délétion affecte aussi la région codant pour l'antigène moyen T (MT). P155 diffère des mutants *ts* précoces classiques de Py (mutants *tsa*) dans la mesure où, comme eux, il est incapable de se répliquer à la température restrictive de 39°C (Eckhart, 1974; Fried, 1965), mais contrairement à eux, il peut transformer les cellules à cette température (Eckhart, 1969, 1974). La figure 1 montre l'organisation fonctionnelle du virus Py (souche A2).

Différents clones Cyp ont été isolés et la cartographie des génomes viraux intégrés a été effectuée par Chartrand *et al.* (1981). Lorsque les cellules Cyp sont transférées de 39°C à 33°C, il y a excision et accumulation intracellulaire de génomes viraux (Bourgaux *et al.*, 1978; Delbecchi *et al.*, 1981; Sylla *et al.*, 1980). Dans un clone

FIGURE 1: Organisation fonctionnelle du génome Py

La carte circulaire du génome viral (souche A2) est divisée en 100 unités distribuées dans le sens horaire à partir du site EcoRI (0/100). Le site de restriction HpaII à 70.5 définit l'origine de réplication de l'ADN viral et marque le début de la numérotation nucléotidique (0/5292), elle aussi en sens horaire (Griffin *et al.*, 1981). La portion codante de l'ADN et les protéines correspondantes sont indiquées par des flèches. Les numéros situés à l'intérieur de ces flèches donnent les coordonnées en nucléotides des différentes protéines. Les zigzags représentent les parties épissées des ARNm. La position de certains sites de restriction est indiquée et les fragments HpaII (1 à 8) sont également montrés. Py code pour 3 protéines précoces, les antigènes petit T (ST), moyen T (MT) et grand T (LT) - ce dernier étant absolument requis pour la réplication de l'ADN viral - et 3 protéines tardives, VP1, VP2 et VP3 (Tooze, 1980).



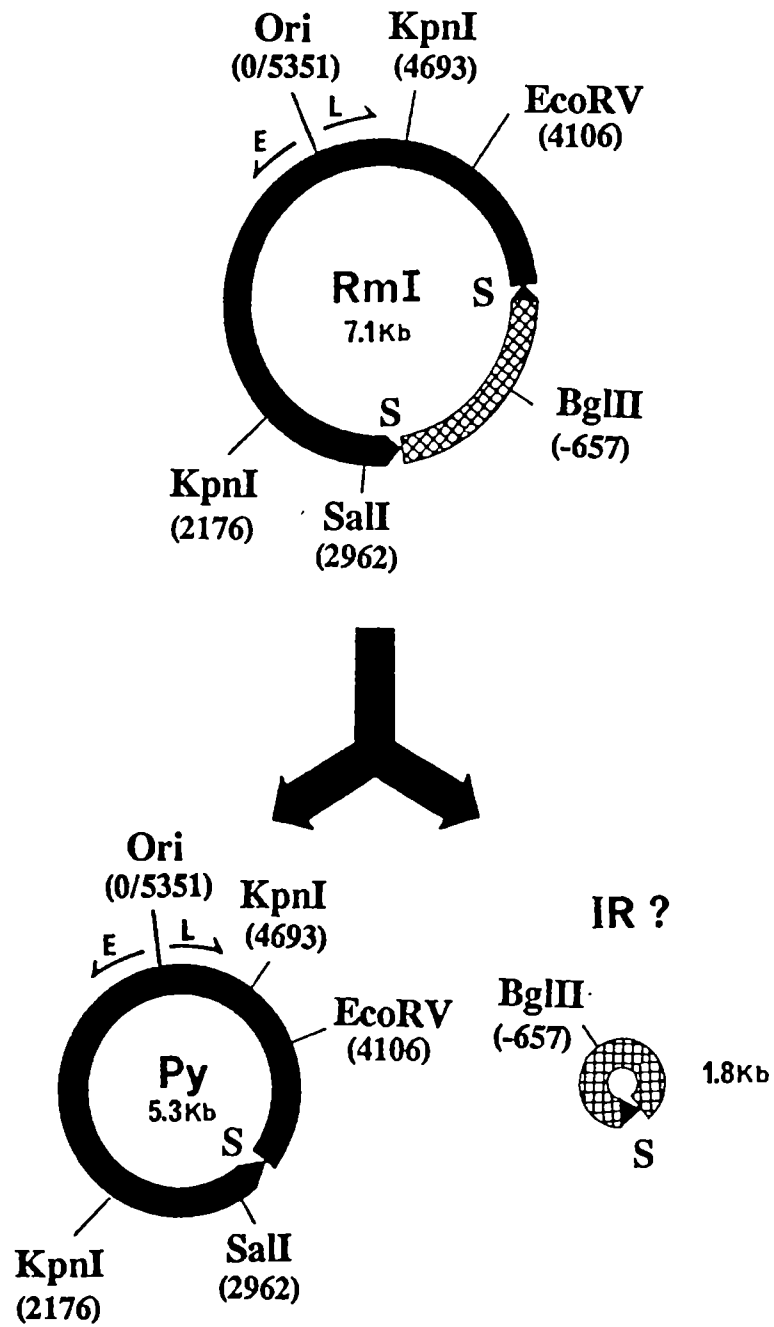
5292 bp

particulier, le clone C12/a1, une telle induction amène la production d'une autre molécule, appelée RmI, dans un rapport moléculaire RmI:P155 de 20:1 (Sylla *et al.*, 1980). Comme mentionné dans le premier paragraphe de cette section, RmI est une molécule hybride produite par recombinaison site-spécifique entre l'ADN viral intégré et les séquences cellulaires flanquantes (Sylla *et al.*, 1984b), et comportant 1,03 copie de P155 liée à 1628 pb d'ADN de souris appelé Insertion ou Ins (Sylla *et al.*, 1984a; Fig.2). Aux extrémités de Ins, nous retrouvons une répétition inversée imparfaite de 7 pb flanquée d'une répétition virale directe de 182 pb s'étendant des nt 3092 à 3273 (répétitions S; Bourgaux *et al.*, 1982). L'Ins, par sa position, interrompt la séquence codant pour la protéine tardive VP1 (nt 4074 à 2926, Fig.1).

Piché et Bourgaux (1987a) ont montré que RmI est une molécule hautement infectieuse à 33°C dans des cellules normales de souris (3T6), et que cette infectivité reflète la capacité de RmI à générer de l'ADN viral de longueur unitaire (P155) par recombinaison intramoléculaire entre les répétitions S (Fig.2). La molécule RmI nous semblait donc être un excellent substrat pour étudier la recombinaison chez la cellule de mammifère, et ce pour plusieurs raisons. Premièrement, la petite taille du génome Py (5,3 kb) fait que seulement trois protéines non-structurales, les protéines précoces ST, MT et LT (Tooze, 1980; voir Fig.1) sont codées par l'ADN viral. En conséquence, c'est la machinerie enzymatique cellulaire qui est principalement responsable de la réplication, de la réparation, de la transcription et probablement de la recombinaison de l'ADN viral. Deuxièmement, la molécule d'ADN Py est complexée, à l'intérieur de la cellule et à l'intérieur de la nucléocapside, aux histones cellulaires (Tooze, 1980). RmI se retrouve

FIGURE 2: Carte physique de RmI et du produit de recombinaison P155

RmI est un réplicon hybride de 7,1 kb composé d'ADN de souris (Ins, boîte quadrillée à numérotation négative) et d'ADN Py (boîte noire). L'ADN Py consiste en un génome entier de P155, dont une partie est dupliquée (nt 3092 à 3273; répétitions S, symbolisées par des triangles noirs). Le site unique SalI est utilisé pour cloner RmI dans le vecteur plasmidique pAT153. Les régions où sont initiées les transcriptions précoce (E) et tardive (L) sont indiquées par des flèches pointant dans des directions opposées. Entre ces flèches se trouve l'origine de réplication (Ori). Les sites KpnI, BglII et EcoRV sont des sites auxquels nous référons souvent dans cet ouvrage. Lorsqu'il y a recombinaison entre les répétitions S, RmI est converti en un génome viral de longueur unitaire, P155. Le produit réciproque, IR (Ins + une répétition S), ne peut être amplifié, donc détecté, puisqu'il n'a pas d'Ori.



donc sous forme de chromatine, comme l'ADN de la cellule hôte. Troisièmement, la partie virale de RmI, constituée d'un génome entier de Py, est bien caractérisée (l'ADN de certaines souches Py a été séquencé au complet; Rothwell et Folk, 1988; Tooze, 1980), ce qui fait de RmI un substrat facile à modifier génétiquement. Quatrièmement, l'ADN Py comporte de nombreux éléments régulateurs que nous retrouvons dans le génome des cellules de mammifères. Parmi ces éléments, on compte une origine de réplication, une séquence stimulatrice de la transcription (ou enhancer), deux promoteurs, des signaux de polyadénylation, de terminaison de transcription et d'épissage. Finalement, le fait qu'en l'espace de six jours (voir Matériel et Méthodes, et Résultats), tout événement de recombinaison étant survenu chez RmI soit facilement détectable en fait un système d'étude pratique pour sa rapidité.

C) Conversion de RmI en P155: recombinaison site-spécifique ou homologue?

Sylla *et al.* (1980) ont observé que, contrairement à P155, RmI n'est pas encapsidable (probablement à cause de sa taille trop grande; 7,1 kb). Piché et Bourgaux (1987a) se sont servis de cette observation pour mettre au point un essai de recombinaison basé sur la production de plaques virales. La faculté de RmI à produire des plaques est dépendante de sa capacité à se convertir en une molécule plus petite, encapsidable et codant pour les protéines virales précoces (ST, MT et LT) et tardives (VP1, VP2 et VP3). Les résultats ont clairement montré que l'efficacité avec laquelle des particules virales infectieuses sont produites, suite à la transfection de cellules 3T6 avec RmI, est supérieure à ce que l'on attend pour une recombinaison impliquant une

duplication de 182 pb (100 à 800 fois supérieure à ce que d'autres chercheurs ont observé pour des homologies de cette taille; Rubnitz et Subramani, 1984). L'efficacité de conversion a donc mené les auteurs à proposer un mécanisme de type site-spécifique, plutôt qu'homologue, pour expliquer la résolution efficace de RmI. Toutefois, des expériences de délétion dans les répétitions S n'ont pu mettre en évidence un site privilégié (ou site spécifique) où se ferait l'échange génétique (Frappier *et al.*, 1990). Nous parlerons donc de recombinaison homologue hautement efficace ou, plus simplement, de recombinaison entre les répétitions S, ou SR.

Toujours dans le but de déterminer la contribution des répétitions S dans la recombinaison intramoléculaire, des travaux réalisés par Bourgaux *et al.* (1990) ont montré que, chez des réplicons dérivés de RmI et contenant des répétitions S prolongées par des répétitions virales additionnelles de 1 à 2 kb, la recombinaison se produit de façon préférentielle en aval des premières répétitions S rencontrées en partant des deux côtés de l'origine. Les auteurs suggèrent donc que la recombinaison dépend d'un processus initié à l'origine de réplication et migrant de part et d'autre de cette dernière, comme la réplication ou la transcription.

D) Recombinaison et transcription

Dans le système d'étude utilisé dans le laboratoire du Dr Bourgaux, la détection des molécules, qu'il s'agisse des substrats ou des produits de recombinaison, repose sur leur capacité à se répliquer dans des cellules permissives de souris (voir Matériel et Méthodes, et Résultats). Nous avons toutefois choisi de commencer notre étude par

l'analyse de l'influence de la transcription, plutôt que la réplication, puisque la relation entre transcription et recombinaison semble quelque chose d'établi dans plusieurs systèmes (voir ci-dessous), même si le mécanisme n'est toujours pas compris.

Comment la transcription peut-elle affecter la recombinaison? La transcription, comme la réplication, amène des changements topologiques de l'ADN. Ces stress torsionnels sont éliminés par l'action des ADN topoisomérases (Liu et Wang, 1987). Nous pouvons donc imaginer que n'importe quelle situation ne permettant pas d'éliminer ce stress créera des dommages à l'ADN, dommages qui favoriseront les réarrangements génétiques. Nous pouvons également envisager qu'un changement topologique peut augmenter l'accessibilité de l'ADN aux enzymes impliqués dans la recombinaison. Toutes ces altérations (provoquées par la réplication ou la transcription) sont de nature épigénétique, puisqu'elles sont la conséquence d'un changement topologique et non d'un changement permanent de la séquence d'ADN.

Chez les procaryotes, les résultats obtenus par différents groupes apportent des conclusions différentes quant à l'implication de la transcription dans la régulation de la recombinaison. Certaines études montrent une stimulation de la recombinaison par la transcription (Ikeda et Matsumoto, 1979), d'autres études montrent l'inverse (Cosloy, 1979; Gottesman et Gottesman, 1975).

La situation est exactement la même chez la levure. L'interconversion du "mating-type" chez *S. cerevisiae* est un événement de recombinaison très étudié et de plus en plus compris. Le chromosome 3 de la levure porte d'une part un gène MAT actif (ou exprimé) et d'autre part deux copies du "mating-type" non exprimées, HML et HMR,

détenant l'information du sexe α et du sexe a , respectivement (Herskowitz *et al.*, 1992). Le changement de sexe (α vers a , ou a vers α) implique un transfert d'information d'un locus silencieux au locus MAT. L'événement de recombinaison est déclenché par l'introduction d'une cassure double brin (d.b.) au niveau du locus MAT par l'endonucléase HO. Ce qui est assez surprenant ici, c'est que l'endonucléase HO n'introduit pas de cassure d.b. chez les loci HML et HMR alors qu'ils comportent eux aussi la séquence de clivage reconnue par HO. Afin d'identifier le facteur responsable de cette accessibilité sélective du locus MAT, et pensant que la transcription était peut-être ce facteur, Haber (1992) a inactivé la transcription du locus MAT en délétant la boîte TATA. Il n'a observé aucun effet sur la recombinaison.

Toujours chez la levure, Keil et Roeder (1984) ont montré un lien direct entre transcription et recombinaison. En introduisant le promoteur de l'ARN polymérase I (HOT1) en amont d'une duplication imparfaite (interrompue par le marqueur de sélection URA3), ils stimulent la recombinaison d'une façon orientation-dépendante, selon que le promoteur dirige la transcription vers la duplication (recombinaison) ou en sens inverse (pas de recombinaison). Un terminateur de transcription, introduit entre le promoteur HOT1 (dirigeant la transcription vers la duplication) et la duplication, bloque la stimulation (Voelkel-Meiman et Keil, 1987). Donc ici, la transcription stimule directement la recombinaison contrairement à ce qui a été observé dans le cas du "mating-type".

Enfin, la situation est à peu près la même chez les mammifères. Chez les vertébrés en général, deux types de réarrangement sont particulièrement étudiés: la

recombinaison V(D)J et le "class-switching".

La recombinaison V(D)J est le processus par lequel les exons codant pour le domaine variable des immunoglobulines (Ig) et des récepteurs des cellules T (TCR) sont joints les uns aux autres de façon site-spécifique. Les loci des Ig recombinent dans les cellules lymphoïdes B (très peu dans les cellules T) et les loci des TCR recombinent dans les cellules lymphoïdes T (très peu dans les cellules B). De plus, au cours de la différenciation, les loci recombinent selon un ordre qui est toujours le même: dans la cellule B par exemple, le réarrangement D à J (exons diversité/jonction) des chaînes lourdes précède le réarrangement V (exon variable) à DJ, qui lui est suivi du réarrangement V à J des chaînes légères (kappa ou lambda). L'ordre dans lequel surviennent les réarrangements ainsi que le type cellulaire dans lequel ils surviennent sont dictés par l'accessibilité d'un locus donné à la recombinaison. Alt *et al.* (1987) proposent alors que la transcription est cet élément donnant accès à l'ADN, puisqu'ils observent que le réarrangement d'un segment donné est toujours précédé par son activation transcriptionnelle. Des données plus récentes ont montré que la délétion d'un promoteur (arrêt de la transcription) n'affecte pas la recombinaison chez un substrat intégré (Engler *et al.*, 1991). Hsieh *et al.* (1992) sont arrivés à la même conclusion en utilisant cette fois un substrat extrachromosomique (on évite ici l'influence transcriptionnelle des régions voisines). Un changement du taux de transcription d'un facteur 1000 n'est pas accompagné d'une modification du taux de recombinaison. Etant donné que ni la présence de promoteurs, ni le processus de transcription même ne semblent affecter la recombinaison, qu'est-ce qui peut provoquer cette accessibilité sélective pour le

réarrangement de type V(D)J? Des résultats récents semblent indiquer qu'un enhancer confère une telle accessibilité à des séquences voisines et ainsi stimule la recombinaison (Capone *et al.*, 1993; Jenuwein *et al.*, 1993).

La recombinaison "class-switching" est responsable du changement isotypique de la région constante des chaînes lourdes. C'est elle qui permet à un IgM de se transformer en IgG, IgA ou IgE, par une recombinaison de type homologue (la recombinaison se fait au hasard dans une région d'homologie de 1 à 2 kb). Contrairement à ce qui a été observé pour la recombinaison V(D)J, la délétion d'un promoteur en amont d'une région de "switch" inhibe le réarrangement (Gu *et al.*, 1993). De plus, la substitution d'un promoteur inductible par un promoteur constitutif amène un réarrangement indépendant de toute stimulation par une cytokine ou un agent mitogène, deux substances normalement requises pour provoquer la recombinaison (Xu *et al.*, 1993).

Toujours chez les mammifères, et plus précisément dans les cellules d'ovaires d'hamster chinois, Nickoloff et Reynolds (1990) ont montré que la recombinaison intermoléculaire (et extrachromosomique) entre deux plasmides portant chacun une copie défectueuse du gène de résistance à la néomycine, est stimulée lorsque la transcription d'un des deux plasmides est induite par le dexaméthasone (le promoteur MMTV, inductible par le dexaméthasone, se retrouve en amont du gène de résistance à la néomycine chez un des deux plasmides). Nickoloff (1992) est arrivé à la même conclusion en utilisant des substrats intégrés plutôt qu'extrachromosomaux.

La base de l'association transcription/recombinaison, même quand celle-ci semble clairement établie, est encore incertaine. Trois hypothèses ont été émises pour

expliquer cette association (Gangloff *et al.*, 1994). Premièrement, la transcription peut faire partie du mécanisme de recombinaison (par exemple, l'ARN polymérase peut être une composante du complexe de recombinaison). Deuxièmement, la transcription peut altérer la structure du substrat au niveau de l'ADN ou de la chromatine de façon à favoriser la recombinaison (accessibilité à des protéines spécialisées). Troisièmement, transcription et recombinaison sont peut-être deux processus liés de façon temporelle, mais non mécanique (des conditions ou des facteurs stimulant la transcription favoriseraient aussi la recombinaison). En ce qui concerne la régulation de la transcription chez Py (et donc son importance éventuelle dans la recombinaison chez RmI), la situation est là aussi passablement complexe.

E) Région intergénique de Py

1. Organisation physique

Le génome de Py comporte une région intergénique d'environ 400 pb contenant les éléments régulateurs de la réplication (ori) et de la transcription (promoteurs précoce et tardif). L'ensemble est représenté à la figure 3.

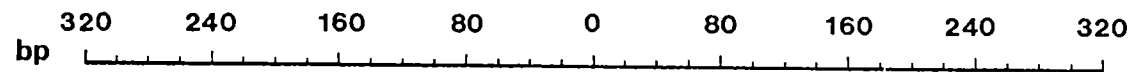
L'**origine minimale** est composée de deux éléments: l'"ori-core" (nt 5271 à 42), lui-même constitué d'une séquence riche en A/T, d'un palindrome central et d'une répétition inversée (Hendrickson *et al.*, 1987), et un second élément pouvant être le noyau α de l'enhancer A (nt 5108 à 5130) ou le noyau β de l'enhancer B (5130 à 5179). Ces deux éléments sont absolument requis *en cis* pour la réplication (Muller *et al.*, 1983;

FIGURE 3: Eléments régulateurs entourant l'origine de Py(Hendrickson *et al.*, 1987; DePamphilis, 1988)

Les 640 pb centrées sur l'origine de réplication (pb 0) sont montrées ici. L'origine de réplication est constituée de deux éléments: 1) le "core" ou noyau (boîte pleine), séquence absolument requise en *cis* pour la réplication et 2) l'élément auxiliaire (boîte vide), séquence stimulatrice non essentielle à la réplication. Les sites de fixation de l'antigène LT sont représentés par des boîtes hachurées (A, B et C) ou vides (1, 2 et 3), le degré d'affinité des sites pour la protéine étant indiqué entre parenthèses (B, C > A > 1, 2, 3). Les sites d'initiation des messages précoces et tardifs sont représentés par des flèches et la boîte TATA précoce par un carré noir. La région "enhancer" comprend les sous-domaines A, B, C et D (Veldman *et al.*, 1985), qui correspondent sensiblement aux éléments alpha (α) et beta (β) requis pour l'activation de la transcription et de la réplication (Muller *et al.*, 1983). Pour α et β , comme pour l'origine, les boîtes pleines représentent les séquences absolument nécessaires en *cis* pour la réplication, les boîtes vides représentant des séquences stimulatrices mais non essentielles.

REGION TARDIVE

REGION PRECOCE



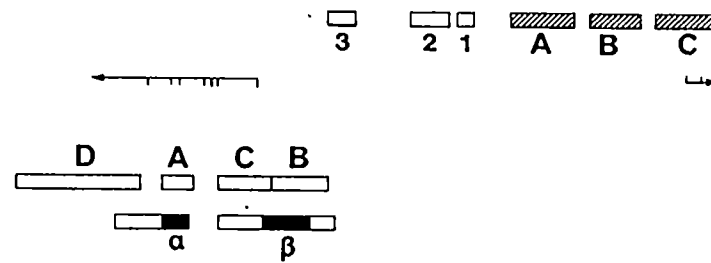
ORI CORE

TATA

LT binding sites
(B,C>A>1,2,3)

mRNA

Enhancer



voir paragraphe sur l'enhancer).

Dans la région intergénique, se retrouvent également des **sites de fixation à LT** ayant divers degrés d'affinité pour le ligand. La séquence consensus du motif de fixation est la suivante: 5'-(G/T)(A/G)GGC-3'. Le site B (nt 82 à 112, 2 motifs de fixation) et le site C (nt 121 à 161, 4 motifs) sont deux sites de haute affinité à LT. Le site A (nt 40 à 68, 3 motifs) a une affinité moindre que les deux précédents mais quand même supérieure aux sites 1 (nt 5292 à 10), 2 (nt 5261 à 5288) et 3 (nt 5215 à 5230). La différence d'affinité entre les sites peut s'expliquer par le nombre de motifs de fixation, par leur degré d'homologie à la séquence consensus, ainsi que par l'espacement entre deux motifs (idéalement entre 9 et 11 pb; Cowie *et al.*, 1984). L'"ori-core", qui chevauche les sites A, 1 et 2, et l'enhancer, qui comprend une partie du site 3, comptent respectivement quatre et deux motifs LT.

L'**enhancer** (5028-5268; Tyndall *et al.*, 1981) est une entité requise pour la réplication et la transcription (Veldman *et al.*, 1985). Il est divisé en deux régions (Herbomel *et al.*, 1984), l'enhancer A (5022 à 5131) et l'enhancer B (5131 à 5265), elles-mêmes divisées en sous-régions (Veldman *et al.*, 1985). Les enhancers A et B comportent un élément "core", α (5108 à 5130) et β (5179 à 5214) respectivement, et un élément auxiliaire, δ (5021 à 5108) et τ (5130 à 5179) respectivement. L'élément "core" (ou noyau) est absolument requis *en cis* pour la réplication alors que l'élément auxiliaire est facultatif (Muller *et al.*, 1983). L'enhancer Py comporte différents motifs retrouvés chez d'autres enhancers, lesquels semblent être des sites fixant des facteurs de transcription (Veldman *et al.*, 1985). Une délétion des nt 5079 à 5133 (enhancer A) ou

des nt 5133 à 5232 (enhancer B) diminue légèrement le taux de réplication, alors que la délétion des nt 5079 à 5232 (enhancer A +B) est létale. En l'absence de réplication et de LT, l'activité du promoteur précoce est diminuée de 50% en absence de l'enhancer A, de 10% en absence de l'enhancer B et de 90% en absence de tout enhancer (Nilsson *et al.*, 1991). L'activité enhancer du segment A semble due principalement à la liaison des facteurs de transcription PEA1, PEA2 et PEA3 (Martin *et al.*, 1988; Nilsson *et al.*, 1991; Yoo *et al.*, 1991).

Le promoteur précoce (Pe) comprend une boîte TATA (nt 120 à 127) ainsi que les enhancers A et B, dont nous venons de voir la contribution relative dans la transcription précoce. La boîte TATA ne semble pas nécessaire *in vivo* à l'activité du promoteur précoce (Bendig *et al.*, 1980; Cereghini *et al.*, 1983; Dailey et Basilico, 1985; Katinka et Yaniv, 1982).

Le promoteur tardif (Pl) est un promoteur de type "TATA-less". Il est constitué d'un promoteur basal, dont la composition varie selon les auteurs (éléments α et β : Adami et Carmichael, 1987; éléments α et δ : Bourachot *et al.*, 1989; éléments β et δ : Kern et Basilico, 1986), et d'un élément stimulateur (nt 4900 à 5022) d'après Bourachot *et al.* (1989). Cet élément stimule 12 fois l'activité du promoteur basal dans les 3T6, le sous-segment 5003-5022 stimulant à lui seul le promoteur de base d'un facteur 4. La séquence stimulatrice pourrait affecter la stabilité des messages primaires. Enfin, une particularité du promoteur tardif est qu'il se situe en aval des principaux sites d'initiation de la transcription (initiation hétérogène centrée principalement autour du nt 5126), situation assez rare en ce qui concerne les promoteurs reconnus par l'ARN polymérase

II (Bourachot *et al.*, 1989).

2. Régulation de la transcription

Le cycle lytique du virus Py dans des cellules permissives de souris comprend la transition d'une phase précoce à une phase tardive caractérisée par l'expression de différents groupes de gènes. Tôt dans l'infection, il y a accumulation préférentielle des ARNm précoces suite à l'épissage alternatif d'un unique transcrit primaire. Après l'enclenchement de la réplication, la balance entre les messages précoces et tardifs est inversée. En d'autres termes, 12 hres post-infection (donc avant réplication), le rapport ARNm précoces/ARNm tardifs est de 4:1. 24 hres post-infection, le rapport est de 1:80. Un facteur d'environ 300 sépare ces deux rapports (Hyde-DeRuyscher et Carmichael, 1988). L'activation des gènes tardifs chez Py semble être **réplication-dépendante** puisque: 1) des mutants de Py codant pour un LT *ts* ne passent pas en phase tardive à température restrictive (Farmerie et Folk, 1984); 2) l'AraC (cytosine arabinoside), un inhibiteur de la réplication, bloque la transition précoce/tardif (ici, les protéines précoces sont présentes, mais il n'y a toujours pas activation de la transcription tardive; Hyde-DeRuyscher et Carmichael, 1988; Hyde-DeRuyscher et Carmichael, 1990); 3) les gènes tardifs ne sont généralement pas exprimés (ou à un taux très faible) chez des cellules de rats, non permissives, transformées par Py (Kern *et al.*, 1987). Les chercheurs ne s'entendent toujours pas pour expliquer cette transition. Yoo *et al.* (1991) proposent qu'il y a déplétion d'un facteur de transcription clé, possiblement TFIID, suite à l'accumulation d'ADN viral lors du cycle lytique. Cette déplétion pourrait amener un

défaut d'assemblage du complexe transcriptionnel TFIID-dépendant au niveau du Pe, et avoir comme conséquence l'activation du Pl, qui ne fonctionnerait bien qu'en l'absence de TFIID. D'autre part, les travaux de Hyde-DeRuyscher et Carmichael (1988) montrent clairement que l'expression des gènes tardifs n'est pas, ou est très peu, régulée au niveau de l'initiation de la transcription, mais qu'elle l'est plutôt au niveau de la maturation des messages. Tôt dans l'infection, il y a transcription efficace des gènes tardifs suivie d'une terminaison tout aussi efficace (>90%), mais les transcrits primaires sont épissés de façon inefficace ce qui empêche leur accumulation. En phase tardive (donc après réplication), l'efficacité de la terminaison de la transcription serait réduite (<40%), menant ainsi à la production de transcrits multigénomiques épissés plus efficacement et permettant l'accumulation rapide d'ARNm tardifs. Cette accumulation serait donc réglée par la stabilité des messages, laquelle serait reliée à la terminaison de la transcription et/ou à l'épissage de l'ARN (Hyde-DeRuyscher et Carmichael, 1988). Le titrage d'un facteur *trans* se liant à l'ARN et régulant l'élongation du complexe transcriptionnel serait l'élément responsable de cette transition (Liu et Carmichael, 1993). Toutefois, des résultats obtenus par Lanoix *et al.* (1991) montrent qu'il est possible d'obtenir des messages tardifs stables (et une expression adéquate des gènes tardifs) sans qu'il y ait épissage de transcrits multigénomiques.

Enfin, les dernières données concernant la régulation de la transcription précoce réfutent l'hypothèse que la fixation de LT aux sites de liaison bordant l'origine de réplication (sites A et 1) amène une répression de cette transcription (Hyde-DeRuyscher et Carmichael, 1988; Munholland *et al.*, 1992). On a longtemps cru que tel était le cas

(Cogen, 1978; Cowie et Kamen, 1984; Dailey et Basilico, 1985). La protéine LT semble par contre impliquée dans l'activation du promoteur tardif. Cette trans-activation ne semble pas nécessiter la liaison de LT à l'ADN, puisqu'un LT mutant incapable de lier l'ADN active le promoteur tardif (ce mutant active également le promoteur précoce; Bergqvist *et al.*, 1990).

La démarche expérimentale proposée a consisté à déterminer si la recombinaison chez RmI était influencée par la transcription virale précoce et/ou tardive et, notamment, si certains des éléments régulateurs de la transcription étaient impliqués dans le mécanisme de recombinaison.

MATERIEL ET METHODES

A. CLONAGE MOLECULAIRE DANS *E. coli*

1. Bactéries et vecteur plasmidique

La souche DH5 α de *E. coli* (commercialisée par GIBCO/BRL sous forme déjà compétente) est utilisée lors des transformations bactériennes avec le vecteur plasmidique pAT153, un dérivé de pBR322 où les nt 1646 à 2351 ont été délétés (Twigg et Sherratt, 1980).

2. Enzymes de restriction et électrophorèse

Les endonucléases de restriction sont utilisées dans les conditions recommandées par le fournisseur (Pharmacia). Après digestion enzymatique, les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse sur gels d'agarose horizontaux (agarose Seakem 0,8 %) dans du tampon E (Tris-HCl 40 mM, acétate de sodium 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7,9). Les gels sont colorés dans une solution de bromure d'éthidium (EtBr) à 2 ug/ml et photographiés sous U.V. (254 nm) à l'aide d'une caméra Polaroid.

3. Purification sur gel préparatif et élution

Pour isoler un fragment d'ADN particulier, on sépare d'abord le mélange de fragments par électrophorèse sur gel d'agarose, puis l'élution de l'ADN est effectuée à l'aide d'une membrane DEAE NA45, selon le protocole du fournisseur (Schleicher and Schuell).

4. Ligation

Les ligations intra- et intermoléculaires sont effectuées avec la T4 DNA ligase d'Amersham dans les conditions suggérées par le fournisseur. Les concentrations d'ADN sont d'environ 5 ug/ml pour une ligation intramoléculaire et 20 ug/ml pour une ligation intermoléculaire. Les températures d'incubation sont de 16°C pour la ligation d'extrémités cohésives et de 20°C pour des extrémités franches.

5. Déphosphorylation des vecteurs plasmidiques

Avant d'effectuer une ligation intermoléculaire vecteur-insert, le vecteur est déphosphorylé à l'aide de la phosphatase alcaline de *E. coli* A19 (Amersham), dans les conditions suggérées par le fournisseur.

6. Transformation bactérienne et sélection

La souche hautement compétente DH5 α est transformée selon la méthode proposée par King et Blakesley (1986). L'étalement est fait sur milieu LB (Luria-Bertani) contenant de l'agar 1,4% et de l'ampicilline (50 ug/ml). Le clonage est fait dans le gène de résistance à la tétracycline, on sélectionne donc les bactéries résistantes à l'ampicilline.

7. Amplification et purification des plasmides

C'est la méthode proposée par Holmes et Quigley (1981) qui est utilisée pour extraire rapidement l'ADN plasmidique des colonies bactériennes Amp^r.

Pour la fabrication d'un stock plus important, on procède à une amplification de la souche bactérienne sur 500 ml de milieu de culture et l'ADN est extrait et purifié avec l'ensemble "Magic™ Maxipreps DNA purification System" de Promega, selon le protocole fourni par la compagnie.

8. Amplification de l'ADN *in vitro* par PCR

L'amplification est réalisée selon la méthode proposée par Saiki *et al.* (1985), à l'aide de 5 U de la polymérase "Hot Tub" (Amersham), sur 1 ng d'ADN en solution dans du T.E.N. (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 10 mM, pH 8). Des cassures sont préalablement introduites dans l'ADN par un traitement de 5 min à 100°C.

Les trois étapes d'un cycle d'amplification, d'une minute chacune, sont la dénaturation, l'hybridation et la polymérisation, qui se font à des températures de 94, 55, et 72°C respectivement.

Le programme compte 25 cycles dont les premier et dernier diffèrent légèrement du reste du programme. Le cycle #1 comporte une période de dénaturation de 1,5 min et le cycle #25 comporte une période d'élongation de 10 min à 72°C, suivie de 15 min à 25°C.

Les amorces utilisées sont synthétisées selon la méthode de Schulhof *et al.* (1987) et à l'aide d'un appareil Gene Assembler Plus (Pharmacia/LKB). La liste des amorces employées dans la construction des différentes molécules dérivées de RmI est donnée dans la section "Construction des ADN plasmidiques".

B. ESSAI DE REPLICATION- RECOMBINAISON

1. Cellules

Deux lignées cellulaires de souris permissives pour Py sont utilisées pour les transfections, les lignées Swiss 3T6 et *scop*-T1. Les *scop*-T1 sont des cellules dérivées des C127 et transformées par un recombinant contenant le fragment HaeII-A du génome de Py sous la dépendance du promoteur précoce de SV40; elles produisent constitutivement les protéines précoces de Py (Rautmann *et al.*, 1982). Avant transfection, les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco et Freeman, 1959) contenant 10% de sérum de veau foetal (SVF), à 37°C, en présence de 10% de CO₂.

2. Préparation de l'ADN plasmidique

Pour tous les plasmides recombinants, le vecteur pAT153 est éliminé de la construction avant transfection par un traitement enzymatique SalI (site de clonage; voir Fig. 2). L'enzyme SalI est inactivé à 68°C pendant 20 min, puis le mélange de digestion est dilué à 1 ml pour effectuer la recircularisation de l'insert. 2 µg d'ADN sont transfectés par Pétri de 10 cm de diamètre.

3. Transfection au DEAE-dextran

Les cellules sont transfectées à une confluence d'environ 70% selon la méthode proposée par Sussman et Milman (1984). Deux modifications sont toutefois apportées à la technique: 1) Des périodes d'incubation de 1 heure à 5% de CO₂ et de 3 heures à 10%

de CO₂ précèdent le choc au DMSO; 2) Le choc est effectué avec du DMSO 10% dans du DMEM contenant 10% de SVF.

Après transfection, les cellules sont maintenues durant 5 ou 6 jours à 33°C, sauf indication contraire (voir les légendes des figures), toujours dans du DMEM avec 10% de SVF et dans une atmosphère riche en CO₂ (10%).

4. Extraction de l'ADN de faible P.M.

L'ADN de faible P.M. est extrait des cellules selon la technique décrite par Hirt (1967). L'extrait est déprotéinisé en effectuant deux extractions au phénol saturé (Tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM, pH 8) et une extraction au chloroforme-isoamylalcool (24:1). L'ADN est précipité avec un volume égal d'isopropanol, resuspendu dans de l'eau stérile puis le matériel équivalant à 1/5 de Pétri est digéré par DpnI (qui introduit plusieurs cassures dans l'ADN méthylé par l'activité damI de *E. coli*, donc non répliqué) et un autre enzyme de restriction (voir Résultats et les légendes des figures).

5. Buvardage

Après avoir subi une digestion enzymatique et une séparation par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, l'ADN de faible P.M. est transféré du gel sur un filtre de nylon (Hybond-N⁺, Amersham) à l'aide d'un appareil VacuGene Pharmacia/LKB n°2016 et sous une pression de 45 cm.H₂O.

L'ADN est dépuriné avant transfert durant 20 min avec une solution de HCl 0,25 N, puis dénaturé et transféré durant 60 min avec un mélange NaCl 1,5 M - NaOH 0,5

N. Après le transfert, le filtre est rincé dans une solution de SSC 5X (NaCl 0,75 M - citrate de sodium 0,075 M) pendant 1 min avant d'être soumis à la procédure d'hybridation.

6. Préhybridation, hybridation et lavages

La préhybridation et l'hybridation des filtres de nylon sont faites selon van der Ploeg et Flavell (1980), en tenant compte des modifications apportées par Chartrand *et al.* (1981).

Les filtres sont lavés 2 X 30 min à 68°C avec le mélange SSC 2X - SDS 0,1%, puis 2 X 30 min à 68°C avec du SSC 2X. Les filtres sont séchés pendant 15 min sous une lampe Flood de 300 watts, puis mis à autoradiographier à -80°C avec des films Hyperfilm™X-MP (Amersham) en présence d'écrans intensifiants (Cronex par Speed, Dupont). Les autoradiogrammes obtenus sont analysés à l'aide d'un densitomètre Corning (système 750), et les pics correspondant aux différents ADN sont découpés et pesés sur une balance de précision.

7. Marquage de l'ADN *in vitro*

Nous utilisons la méthode décrite par Feinberg et Vogelstein (1983, 1984), et la trousse Amersham "Multiprime" (RPN.1601Y). Brièvement, la réaction implique l'extension d'amorces hexanucléotidiques de séquence aléatoire, appariées à l'ADN matrice dénaturé, sous l'action du grand fragment de Klenow de l'ADN polymérase I de *E. coli*. La sonde est fabriquée selon le protocole d'Amersham, dans un volume de 50

μl contenant 50 μCi de $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Amersham, PB.10205, 3000 Ci/mmol) et 2 U de l'enzyme de Klenow. Après une incubation d'une heure à 37°C, le mélange réactionnel est amené à un volume final de 500 μl avec de l'eau distillée. Pour déterminer l'activité spécifique de la sonde (cpm/ μg), 2 μl de la réaction sont précipités à l'acide trichloroacétique 5% sur une membrane Whatman GF/A. La membrane est par la suite rincée à l'éthanol 95%. Le comptage se fait dans du liquide à scintillation Ecolume™ (ICN), à l'aide d'un compteur à scintillation Beckman LS250. La radioactivité spécifique obtenue est en général supérieure ou égale à 5×10^8 cpm/ μg d'ADN.

C. EXTRACTION D'ARN ET PREPARATION POUR LE RT-PCR

L'ARN total est extrait des cellules *scop*-T1 transfectées, après 2 ou 3 jours d'incubation à 33°C (voir Résultats), selon la méthode proposée par Chomczynski et Sacchi (1987). Après la précipitation à l'isopropanol, les étapes de lavage à l'éthanol 75% et de solubilisation avec 0,5% SDS ne sont pas effectuées, le culot d'ARN étant directement resuspendu dans de l'eau filtrée sur Nalgene 120-0020 (l'ARN d'un Pétri de 10 cm est resuspendu dans 50 μl d'eau).

Avant d'effectuer l'analyse des ARNs par RT-PCR, nous devons d'abord éliminer toute trace d'ADN contaminant en soumettant les préparations d'ARN à deux traitements successifs à la DNaseI (RNase-free, Promega). L'ARN d'un Pétri (50 μl) est traité pendant une heure à 37°C avec 2,5 U de DNaseI dans un volume réactionnel de 100 μl . Le mélange réactionnel est composé de 40 mM Tris-HCl pH 7,5, 6 mM MgCl_2 , 2 mM spermidine, 5 mM DTT et 1800 U/ml RNAGuard à 1800 U/ml (Pharmacia). Après

incubation, de l'acétate de sodium et du SDS sont ajoutés à une concentration finale de 0,3 M et 0,2%, respectivement. Le mélange est extrait avec une solution phénol-chloroforme-isoamylalcool (25:24:1) et 1 μ l de glycogène (25 μ g/ μ l) est ajouté à la phase aqueuse. L'ARN est précipité avec 2 volumes d'éthanol 100 % et le culot resuspendu dans 50 μ l d'eau. Ce 50 μ l subit un deuxième traitement à la DNase et le culot final est resuspendu dans 20 μ l d'eau. 2 μ l d'ARN (1/10 de boîte) sont utilisés par réaction RT-PCR.

D. RT-PCR

1. Transcription inverse de l'ARN

La réaction de RT est effectuée dans un volume final de 50 μ l (y compris les 2 μ l d'ARN traité à la DNase). Le mélange réactionnel est constitué de Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, BSA RNase-free (Pharmacia) à 29 μ g/ml, RNAGuard à 1800 U/ml, DTT 4 mM, dNTP 0,24 mM (Pharmacia) et 0,1 μ g d'amorce spécifique de l'ARN (voir Résultats). Avant d'ajouter l'enzyme, soit 0,3 μ l de transcriptase inverse d'AMV (Promega, 5 U/ μ l), le mélange est incubé 3 min à 50°C et 1 min à 30°C. La réaction de polymérisation est effectuée à 37°C pendant 1 heure.

2. PCR

0,1 μ g de chaque amorce (l'amorce RT et l'amorce PCR, voir Résultats) et 0,5 μ l de polymérase AmpliTaq (Roche, 5 U/ μ l) sont ajoutés au mélange de transcription inverse avant l'amplification. Le programme PCR utilisé, appelé "Touchdown" (Don et

al., 1991), se déroule comme suit: dénaturation de 90 sec à 94°C pour toute la durée du programme; renaturation pendant 2 min à une température de 72°C (cycle #1), température diminuant progressivement pour se stabiliser à 50°C (cycle #12) pour le reste du programme; polymérisation de 3 min à 72°C pour toute la durée du programme. Le cycle #12 est répété 44 fois et le programme se termine par une incubation de 15 min à 72°C. L'ADN amplifié est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%, transféré sur nylon et hybridé avec une sonde RmI radioactive. Les échantillons analysés ont été prélevés 4 heures après le début du programme PCR, ce dernier ayant une durée totale de 6 heures 30 min.

3. Liste des amorces utilisées lors des réactions RT-PCR

Les séquences homologues au substrat (Py ou Ins, voir Résultats) sont indiquées en caractères gras, avec les coordonnées en nt entre parenthèses.

a) contrôle interne

PBEcoRI (1556 à 1572): 5'-CGCCCGAATTCAAATGCC-3'

DJ9 (2317 à 2298): 5'-CGTACTCGAGATAAGCGCGGCTGCTAGGCC-3'

b) jonction précoce

DJ3 (3001 à 3020): 5'-CCAAGCTTCAGTCCCATCATACTC-3'

PB11 (-1418 à -1440): 5'-CCCAAACCTGGATCAAACCAGAAC-3'

c) jonction tardive

PB10 (-264 à -245): 5'-ACCCTGACTAAGACAGGATC-3'

DJ8 (3291 à 3270): 5'-GTGTCTCGAGTGCTCCTAGATGAAAATGGAG-3'

CONSTRUCTION DES ADN PLASMIDIQUES

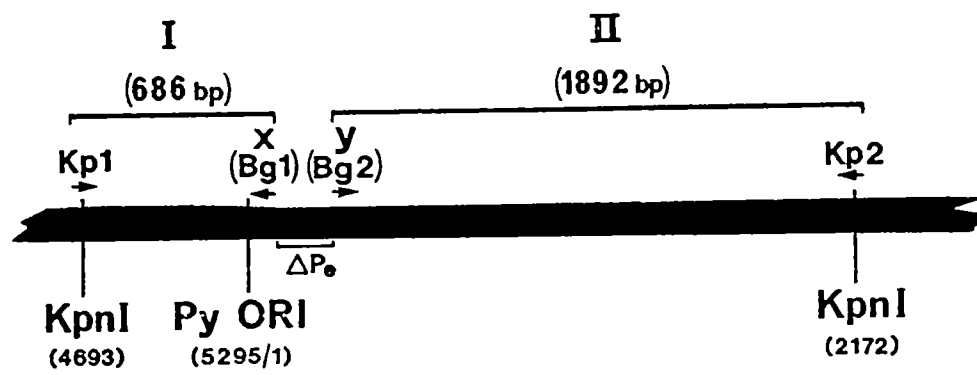
A. Mutants précoces de RmI

Les molécules Δ Pe, Δ BT, Δ TC, Δ BTC et Σ T dérivent toutes de B1-20, ou pRmI (RmI cloné au site SalI dans le vecteur plasmidique pAT153; Piché et Bourgaux, 1987a). Chaque fragment portant la mutation a été généré par l'union de deux segments d'ADN synthétisés par PCR (Saiki *et al.*, 1985) en utilisant comme matrice de l'ADN Py de souche A3 (Fried *et al.*, 1975; Rothwell et Folk, 1983) et quatre amorces, deux non spécifiques et deux spécifiques (cette section, paragraphe E). Les amorces non spécifiques, Kp1 et Kp2, chevauchent les sites KpnI aux nt 4693 et 2176 (Fig.4). Les deux amorces spécifiques, x et y, bordent la région à déléter et varient donc selon le mutant: Δ Pe, x=Bg1 et y=Bg2; Δ BT, x=Mul et y=Mul2; Δ TC, x=Mul3 et y=Mul4; Δ BTC, x=Mul1 et y=Mul4; Σ T, x=Mul5 et y=Mul6. Les amorces x et y portent à leur extrémité 5' un site de restriction, soit BglII (chez Δ Pe) soit MluI (chez Δ BT, Δ TC, Δ BTC et Σ T). Dans des réactions PCR indépendantes, la paire d'amorces Kp1-x est utilisée pour générer le fragment I et la paire d'amorces Kp2-y utilisée pour générer le fragment II (Fig.4). Les fragments I et II purifiés sont ensuite digérés par BglII (ou MluI), mis en présence l'un de l'autre dans une réaction de ligation et le tout est finalement digéré par KpnI. Le mélange de digestion est déposé sur gel et le produit correspondant à l'union d'un fragment I avec un fragment II est élué à l'aide d'une membrane DEAE NA45 (Matériel et Méthodes). Ce produit, qui correspond au fragment KpnI-A de A3 ayant perdu respectivement 227 pb (Δ Pe), 46 pb (Δ BT), 42 pb (Δ TC) et

FIGURE 4: Introduction de mutations précoces dans RmI

L'exemple donné dans la figure porte sur le mutant ΔPe . Dans des réactions de PCR indépendantes sont synthétisés, à partir de l'ADN de souche sauvage A3, des fragments de 686 pb (amorces Bg1-Kp1) et 1892 pb (Bg2-Kp2), correspondant respectivement aux fragments I et II. Chaque fragment possède à l'une de ses extrémités un site naturel KpnI (nt 2176 pour II et 4693 pour I) et, à l'autre extrémité, un site BglII introduit artificiellement dans les amorces Bg1 et Bg2. Bg1 et Bg2 définissent les limites de la délétion ΔPe (nt 80-306, soit 227 pb; Liste des amorces utilisées, paragraphe E).

Les fragments sont purifiés sur gel préparatif, digérés par BglII puis mis en présence l'un de l'autre dans des conditions favorisant la ligation intermoléculaire (Matériels et Méthodes). Après ligation, l'ADN est digéré par KpnI et le fragment de 2548 pb, correspondant au fragment KpnI-A viral ayant perdu 227 pb dans la région promotrice précoce (Pe), est purifié sur gel et introduit au site KpnI d'une molécule B1-20 (ou pRmI) d'où le fragment correspondant a été délété. ORI: origine de répllication.



80 pb (Δ BTC), ou bien ayant une substitution des pb 120 à 127 (Σ T), est introduit à la place du fragment homologue non muté chez pRmI. Après transformation bactérienne et extraction de l'ADN plasmidique, les recombinants d'intérêt sont sélectionnés par digestion enzymatique (BglII ou MluI+SmaI, selon le cas). Pour tous les mutants, seule l'orientation "normale" du fragment KpnI-A muté (celle du fragment original dans RmI) a été retenue et analysée.

B. Mutants tardifs de RmI

La molécule pRmI Δ E a été générée en remplaçant le fragment KpnI-A de pRmI par le fragment correspondant de la molécule pPvu2035, un mutant de Py de la souche A2 ayant une délétion des nt 5028 à 5268 (un site XhoI se trouve au niveau du site de délétion; Tyndall *et al.*, 1981). Des fragments correspondant à l'enhancer de Py, de souche A3 ou P155 selon la matrice utilisée, ont été fabriqués par PCR en utilisant les amorces En1 et En2 (paragraphe E). Les fragments obtenus ont été digérés par XhoI (un site XhoI se trouve en 5' des amorces utilisées) et introduits séparément au niveau du site unique XhoI de pRmI Δ E, dans la bonne (+) ou la mauvaise (-) orientation, pour donner les mutants Pl (A3 ou P155).

C. Molécules O(5022)/pRmI et O(4633)/pRmI

1) Construction de O(5022)/pRmI

Le plasmide pPB21 (Gélinas *et al.*, 1981), qui consiste en un génome de Py de souche A3 inséré au site BamHI de pBR322, a d'abord été digéré par Sau3A et TaqI, et

le fragment viral Sau3A s'étendant des nt 5022 à 1192 a été isolé d'un gel par élution. Le fragment purifié (1462 pb) a été introduit, dans une orientation ou l'autre, au niveau du site unique BglII de pRmI (Fig.2), pour donner ainsi deux dérivés de ce dernier: O(5022,+)/pRmI et O(5022,-)/pRmI. Le signe (+) signifie que le fragment introduit est en orientation directe avec le fragment correspondant chez RmI, le signe (-) indique l'orientation inverse.

2) Construction de O(4633)/pRmI

Le plasmide pPB21 a ici été soumis à une digestion complète par BamHI et une digestion partielle par Sau3A. Le fragment de 1851 pb, s'étendant des nt 4633 (site BamHI) à 1192 (site Sau3A), a été isolé et introduit au niveau du site unique BglII de pRmI. Encore une fois, deux dérivés ont été obtenus selon l'orientation de l'insert: O(4633,+)/pRmI et O(4633,-)/pRmI.

D. Dérivés de O(4633,+)/pRmI: $\Delta O2$ et DM

1) Construction de $\Delta O2$

$\Delta O2$ a été fabriqué selon la procédure utilisée pour construire les mutants précoces de RmI (paragraphe A et Fig.4). Ici, les amorces ERL1 et ERR1 ont pris la place des amorces Kp1 et Kp2, respectivement, et les amorces CN10 et CN9 ont remplacé les amorces x et y, respectivement. Après traitement ClaI (un site dans CN9 et CN10) et ligation, le fragment résultant (nt 4633 à 1192) a été traité par BamHI (un site dans ERL1 et ERR1) et introduit dans l'orientation directe au site BglII de pRmI. Le

fragment introduit porte une mutation au niveau de l'origine de réplication: sur les 9 nt entre 5278 et 5286, 6 ont été substitués par un site ClaI et les trois autres ont été délétés. La construction obtenue a été appelée $\Delta O2(4633,+)$ /pRmI ou, plus simplement, $\Delta O2$.

2) Construction de DM

Le mutant DM a été fabriqué en introduisant, au niveau du site BglII de ΣT , un fragment allant des nt 4633 à 1192 et synthétisé par PCR à partir du mutant A3⁻ (ou Pl⁻), à l'aide des amorces ERL1 et ERR1.

E. Liste des amorces employées

Les séquences homologues à Py sont en caractères gras, et leurs coordonnées (en nt) sont entre parenthèses. Pour les mutants précoces, les coordonnées de la délétion (Δ) ou de la substitution (Σ) sont également indiquées à côté du nom du mutant.

a. Mutations précoces

amorces non-spécifiques

Kp1: 5'-**TTGTGTAGGTACCGCTGTAT**-3' (4686-4705)

Kp2: 5'-**AGACACTGGTACCAAGCGAC**-3' (2188-2169)

amorces spécifiques (x et y)

Mutant ΔPe ($\Delta 80-306$)

Bgl1: 5'-CGCCAGATCTGT**TTTGACAAGTTGCCT**-3' (79-61)

Bg2: 5'-ACCCAGATCTAGGTGGAAGCCATGCCT-3' (307-323)

Mutant ΔBT ($\Delta 83-128$)

Mu1: 5'-AGCGGACGCGTCCTGTTTTGACAAG-3' (82-67)

Mu2: 5'-AGCGGACGCGTGCCCCAACCGCCTCTTC-3' (129-145)

Mutant ΔTC ($\Delta 122-163$)

Mu3: 5'-AGCGGACGCGTATCAATTTGGGTGGCC-3' (121-105)

Mu4: 5'-AGCGGACGCGTACCACCATCATGGATAG-3' (164-180)

Mutant ΔBTC ($\Delta 83-163$)

Mu1 et Mu4

Mutant ΣT ($\Sigma 120-127$)

Mu5: 5'-AGCGGACGCGTTTCAATTTGGGTGGCCC-3' (119-104)

Mu6: 5'-AGCGGACGCGTTAGCCCCAACCGCCTCT-3' (128-143)

b. Mutations tardives

Mutants Pl ($A3^+$, $A3^-$, $P155^+$ et $P155^-$)

en1: 5'-AGCGGCTCGAGCTTCAGAAGATGGCGG-3' (5026-5043)

en2: 5'-AGCGGCTCGAGACAGCTGTTGTCATAG-3' (5271-5256)

c. Mutations dans O(4633,+)/pRmI

Mutant $\Delta O2$

CN9: 5'-CAGTCATCGATGAGGCCGGGGCCCCTGG-3' (5287-11)

CN10: 5'-CAGTCATCGATCTAAAAAAACAGCTGTTGTC-3' (5277-5257)

ERL1: 5'-GCTGGATCCCGCCATGG-3' (4629-4645)

ERR1: 5'-TACGGATCCTCCATTGGCATG-3' (1199-1179)

TABLEAU RECAPITULATIF DES MOLECULES D'ADN UTILISEES

A2: Souche Py de type sauvage dont l'ADN (5292 pb) a été entièrement séquencé (Soeda *et al.*, 1979). C'est cet ADN qui est représenté à la figure 1.

A3: Autre souche Py de type sauvage dont l'ADN (5295 pb) a également été séquencé (Rothwell et Folk, 1983). Il n'y a pas de différences notables avec l'ADN de type A2.

P16 et P155: Une souche Py de type sauvage (P16) et le mutant dérivé (*ts*P155 ou P155) dont la séquence complète n'est pas connue, mais qui sont apparentés à la souche CSP dont l'ADN (5351 pb) a été séquencé (Rothwell et Folk, 1983). L'ADN de CSP possède notamment, par rapport à A2 et A3, une duplication du noyau α de l'enhancer (pb 5096-5139), duplication retrouvée chez P155 (pb 5101-5145; Daniel Gendron, communication personnelle). L'ADN de P155 possède de plus une délétion dans la région codant pour LT et MT (pb 1348-1359; Gélinas *et al.*, 1982) et une mutation (pb 2658) rendant LT *ts* (Gendron *et al.*, 1988).

RmI: Molécule de base de laquelle sont dérivés tous les mutants (Fig.2)

Δ Pe: Molécule dérivée de RmI ayant une délétion de 227 pb (80-303) et dont le

fragment KpnI-A (4693-2176) a été synthétisé par PCR à partir d'un ADN de souche A3. Les sites B et C de fixation à LT, la boîte TATA et la partie 5' de la séquence codante précoce sont absents.

Δ BT: Molécule construite comme Δ Pe et ayant une délétion de 46 pb (83-128). Le site B de fixation à LT et la boîte TATA sont délétés.

Δ TC: Molécule construite comme Δ Pe et ayant une délétion de 42 pb (122-163). La boîte TATA et le site C de fixation à LT sont délétés.

Δ BTC: Molécule construite comme Δ Pe et ayant une délétion de 80 pb (83-163). Les sites B et C de fixation à LT ainsi que la boîte TATA sont délétés.

Σ T: Molécule construite comme Δ Pe et ayant une substitution des pb 120 à 127 (boîte TATA).

Σ Tbis: Molécule identique à Σ T mais où le fragment MluI-SmaI (couvrant la région codante précoce) a été remplacé par le fragment correspondant de Δ BT.

A3⁺ et A3⁻ (ou PI): Molécules dérivées de RmI ayant un fragment KpnI-A de souche A2 contenant un fragment enhancer (pb 5026-5271) d'origine A3. Les signes + (orientation normale) et - (orientation inverse) font référence à

l'orientation du complexe enhancer/promoteur.

P155⁺ et P155⁻: Identiques aux molécules précédentes mais avec un fragment enhancer d'origine P155.

O(5022)/RmI: Molécule dérivée de RmI possédant un fragment d'origine A3 (pb 5022 à 1192) au niveau du site BglII de l'Ins.

O(4633)/RmI: Molécule dérivée de RmI possédant un fragment d'origine A3 (pb 4633 à 1192) au niveau du site BglII de l'Ins.

Δ O2: Molécule dérivée de O(4633)/RmI dont on a inactivé l'origine de réplication présente dans l'Ins (O2).

DM: Molécule dérivée de Σ T et possédant, au niveau du site BglII de l'Ins, un fragment 4633-1192 d'origine A3⁻.

RESULTATS

A. Mutants précoces de RmI: transfection des cellules 3T6 et *scop*-T1

Comme précédemment montré par Piché et Bourgaux (1987a), la transfection des cellules permissives de souris 3T6 et *scop*-T1 avec RmI amène la production efficace de génomes viraux de longueur unitaire (P155) par recombinaison intramoléculaire entre les répétitions de 182 pb (répétitions S). RmI (7,1 kb), tout comme P155 (5,3 kb), possède une origine de réplication bidirectionnelle et deux promoteurs (Pe, précoce et Pl, tardif) dirigeant la transcription dans des directions opposées (Fig.2). Le Pe est une entité distincte et fonctionnelle alors que le Pl chevauche l'enhancer qui, dans le cas particulier de Py, est requis pour la transcription et la réplication (Veldman *et al.*, 1985).

Des résultats obtenus dans notre laboratoire ont montré que la recombinaison chez RmI est influencée par un processus amorcé à l'origine de réplication et migrant de part et d'autre de celle-ci, comme la réplication ou la transcription (Bourgaux *et al.*, 1990). A la suite de ces résultats, nous avons décidé d'étudier l'influence de la transcription sur la recombinaison (voir Introduction). Il est clair par ailleurs que l'étude du Pe est chose plus simple que celle du Pl, puisqu'en modifiant ce dernier nous risquons d'affecter la réplication. Nous avons donc débuté notre étude par la construction de mutants de RmI ciblant le Pe. Toutefois, en modifiant celui-ci, nous risquons d'affecter la transcription précoce et par le fait même la production des protéines précoces (LT est absolument requis pour l'initiation de la réplication de Py; Francke et Eckhart, 1973). C'est pourquoi deux types cellulaires ont été utilisés pour étudier la recombinaison chez RmI et ses

mutants: les 3T6, des cellules de souris normales permettant la réplication de molécules aptes à coder pour LT, et les *scop*-T1, cellules de souris synthétisant de façon constitutive les protéines précoces de Py (Rautman *et al.*, 1982) et pouvant ainsi assurer la réplication de toutes les molécules ayant une Ori fonctionnelle.

Comme décrit dans la section Construction des ADN plasmidiques, les mutants précoces de RmI ont été construits par PCR. Le fragment KpnI de RmI comportant l'origine, le Pe et le Pl, a été remplacé par le fragment correspondant synthétisé par PCR et comportant différentes modifications du Pe (Fig.5A). Les molécules Δ Pe, Δ BT, Δ TC et Δ BTC sont des mutants comportant respectivement des délétions du Pe et d'une partie de la séquence codante précoce (Δ Pe), du site B de liaison à LT et de la boîte TATA (Δ BT), de la boîte TATA et du site C (Δ TC), et de ces trois derniers éléments (Δ BTC). Le mutant Σ T est un mutant de substitution, où la séquence 120 à 127 (incluant la boîte TATA) a été remplacée par une séquence de longueur identique et comportant un site MluI. RmI et ses mutants précoces ont été transfectés dans les lignées 3T6 et *scop*-T1 pour deux raisons. Premièrement, la protéine virale précoce LT étant absolument requise pour assurer la réplication des molécules transfectées, seuls les mutants transcriptionnellement compétents devraient se répliquer dans les 3T6. Deuxièmement, si la transcription et la recombinaison sont deux processus intimement liés, seuls les mutants capables de se répliquer dans les 3T6 devraient recombiner.

Cinq jours après transfection, l'ADN de faible P.M. a été extrait par la méthode de Hirt (1967), digéré par EcoRV (et DpnI, voir Matériel et Méthodes), soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, transféré sur membrane de nylon et hybridé avec

FIGURE 5: Effets des délétions du Pe sur la recombinaison entre les répétitions S après transfection des cellules 3T6 et *scop*-T1

A. Carte physique de la région régulatrice précoce de Py

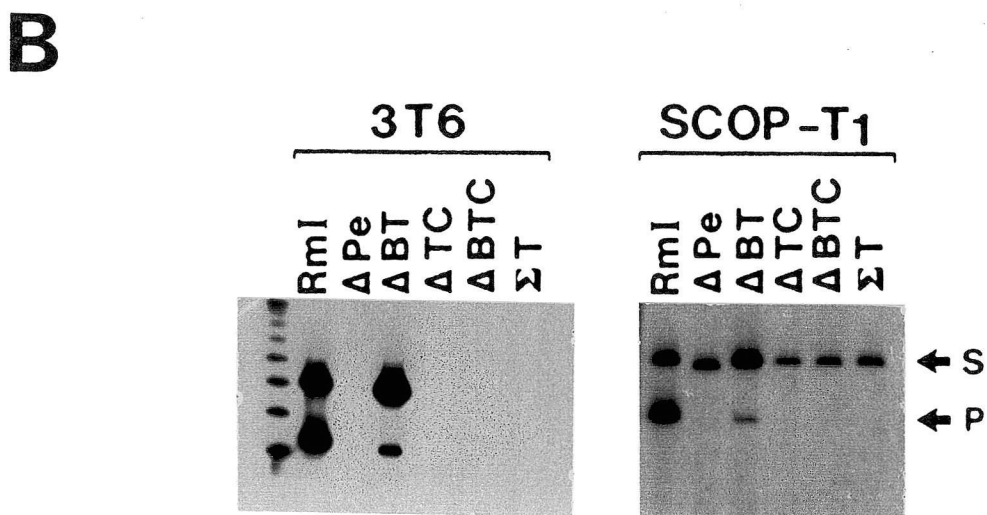
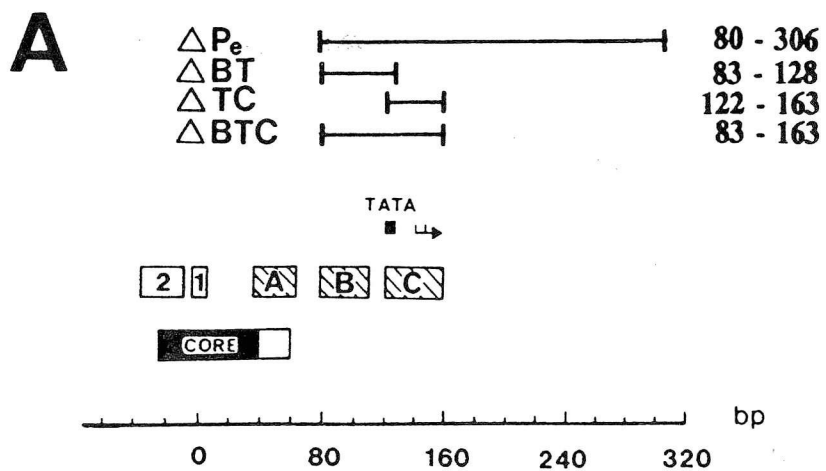
Les délétions des différents mutants (avec leurs coordonnées en nt) sont positionnées par rapport à l'origine de réplication ("core"), aux sites de liaison A, B, C, 1 et 2 de LT, à la boîte TATA ainsi qu'aux sites d'initiation de la transcription (flèche branchée). Chez le mutant ΣT , les nt 120-127 ont été remplacés par huit autres incluant un site MluI (voir Construction des ADN plasmidiques). Rappelons que la région codante précoce commence au nt 173 (voir Fig.1).

B. Recombinaison après transfection

L'ADN récupéré des cellules 5 jours après transfection avec RmI ou l'un de ses mutants a été digéré par EcoRV, qui linéarise les substrats et produits (Fig.2), et DpnI, puis a été soumis à une électrophorèse sur gel horizontal d'agarose 0,8%, transféré sur nylon et hybridé avec une sonde virale radioactive s'étendant des nt 4632 à 1192 (en passant par l'origine). Notons que le RmI utilisé comme contrôle positif est congénère aux mutants; le fragment KpnI comportant l'origine de réplication est de souche A3.

Après avoir passé les autoradiogrammes au densitomètre (Corning 750, Matériel et Méthodes), les rapports P/P+S (produit/produit+substrat) ont été calculés pour chaque molécule transfectée et normalisés par rapport au plus haut d'entre eux.

3T6: RmI (100%), ΔBT (18,2%); ***scop*-T1:** RmI (100%), ΔPe (1,1%), ΔBT (8,3%), ΔTC (1,0%), ΔBTC (2,4 %) ΣT (1,1%).



une sonde virale radioactive correspondant à la région intergénique de Py (pb 4632 à 1192).

L'expérience a révélé deux phénotypes distincts. ΔBT est le seul mutant à se répliquer et à recombiner dans les 3T6 (Fig.5B). Son taux de conversion est toutefois inférieur d'un facteur 5 à celui de RmI. Dans les *scop*-T1, tous les autres mutants se répliquent mais ne recombinent pas (Fig.5B).

A la lumière de ces résultats, il semble qu'un seul des mutants, ΔBT , soit transcriptionnellement compétent, et que transcription et recombinaison soient liées puisqu'aucun autre mutant ne recombine dans les *scop*-T1. Avec ΔBT , nous affectons la recombinaison sans affecter la réplication alors qu'avec tous les autres mutants, la production des protéines précoces est vraisemblablement touchée puisqu'aucun de ces mutants n'est capable de se répliquer dans les 3T6. Notons que pour ΔPe le résultat était prévisible puisque ce mutant a une délétion de la région amino-terminale des protéines précoces (Fig.5A). Le résultat avec ΣT est toutefois assez étonnant puisqu'une substitution de 8 pb amène un changement phénotypique marqué. Comment interpréter ces résultats? A première vue, il y a deux possibilités. Premièrement, les modifications apportées aux différents éléments du promoteur précoce affectent la transcription, et dans le cas où il y aurait une dépendance de la recombinaison vis-à-vis de la transcription, les mutations affectent également la recombinaison. Deuxièmement, en modifiant les éléments régulateurs de la transcription précoce, nous affectons par le fait même la production des protéines précoces. Or, dans la littérature, la protéine LT s'est déjà vue attribuer un rôle de protéine recombinogène (Basilico *et al.*, 1979; Botchan *et al.*, 1980;

Piché et Bourgaux, 1987b; St-Onge *et al.*, 1990). Donc, si dans notre système LT est requis pour la recombinaison intramoléculaire, il n'est pas surprenant que des mutants du promoteur précoce ne recombinent pas. Mais comment expliquer alors que ces mutants ne recombinent pas tous dans les *scop*-T1 qui fournissent du LT en *trans*? Une explication possible est que les *scop*-T1 produisent peut-être suffisamment de LT pour assurer la réplication des mutants mais non leur recombinaison.

Afin de déterminer laquelle des deux possibilités explique ce qui se passe réellement, nous avons décidé de tester d'abord la seconde, en remplaçant les transfections de *scop*-T1 par des expériences de co-transfection de cellules 3T6. Mais avant d'effectuer ces co-transfections, nous avons voulu savoir quelle importance avait la transcription tardive dans la régulation de la recombinaison.

B. Mutants tardifs de RmI: transfection des cellules 3T6 et *scop*-T1

Comme il en a déjà été fait mention, la délétion du PI ne peut se faire sans affecter simultanément réplication et transcription, puisque le PI et l'enhancer se chevauchent (complexe PI/enhancer). Inverser plutôt que déléter ce complexe était donc un moyen efficace d'affecter la transcription sans toucher la réplication (les enhancers fonctionnent dans les deux orientations contrairement aux promoteurs; de Villiers et Schaffner, 1981). Dans un premier temps, nous avons fabriqué un mutant de RmI ne possédant pas le complexe PI/enhancer en remplaçant le fragment KpnI de pRmI, comportant les éléments régulateurs de la transcription, par le fragment correspondant de pPvu2035 (Py A2 cloné ayant une délétion des pb 5028 à 5268; Tyndall *et al.*, 1981).

La molécule résultante a été nommée pRmIΔE. Dans un second temps, nous avons amplifié par PCR la région s'étendant des pb 5026 à 5271 en utilisant comme matrice l'ADN des souches A3 et P155 (voir Construction des ADN plasmidiques). Finalement, chacun des deux fragments amplifiés a été inséré au niveau du site de délétion chez pRmIΔE. De cette façon, nous avons produit quatre mutants tardifs de pRmI, deux ayant un insert correctement orienté (A3⁺ et P155⁺) et deux autres ayant un insert orienté de façon inverse (A3⁻ et P155⁻; Fig.6A). Les quatre mutants ont été transfectés dans les 3T6 et les *scop*-T1 et analysés comme décrit dans la section précédente (Fig.6B). Dans les deux lignées, tous les mutants se répliquent quelle que soit l'orientation de l'insert (bande S), ce qui confirme que les séquences stimulatrices de l'enhancer fonctionnent indépendamment de leur orientation. Toutefois, les constructions (+) et (-) ne se comportent pas de la même façon au niveau de la recombinaison: seules les constructions (+) recombinent efficacement, quel que soit le type cellulaire utilisé (bande P). Ce résultat suggère que l'intégrité des Pe et Pl semble nécessaire pour stimuler la recombinaison entre les répétitions S. Fait à remarquer, les mutants tardifs ne comportent aucune délétion; les séquences exerçant une activité en *cis* sont toutes présentes.

C. Co-transfection des cellules 3T6 avec les mutants précoces et l'ADN sauvage de Py

Les cellules 3T6 ont été transfectées avec des quantités constantes des mutants précoces et des quantités croissantes d'ADN sauvage de Py, soit pPB21 (génome A3 cloné au site BamHI du vecteur plasmidique pBR322; Gélinais *et al.*, 1981).

FIGURE 6: Influence de l'orientation du PI sur la recombinaison entre les répétitions S

A. Carte physique de la région régulatrice tardive de Py

Les fragments d'ADN P155 et A3 (avec leurs coordonnées en nt) introduits au site XhoI de pRmIΔE (Construction des ADN plasmidiques) sont représentés, avec l'origine minimale de réplication ("core" + éléments α et β), les sites A, 1, 2 et 3 de fixation de LT, l'enhancer et les sites d'initiation de la transcription (flèche branchée). Notons que chez P155, il y a duplication de la séquence s'étendant des nt 5101 à 5145 (D. Gendron, communication personnelle).

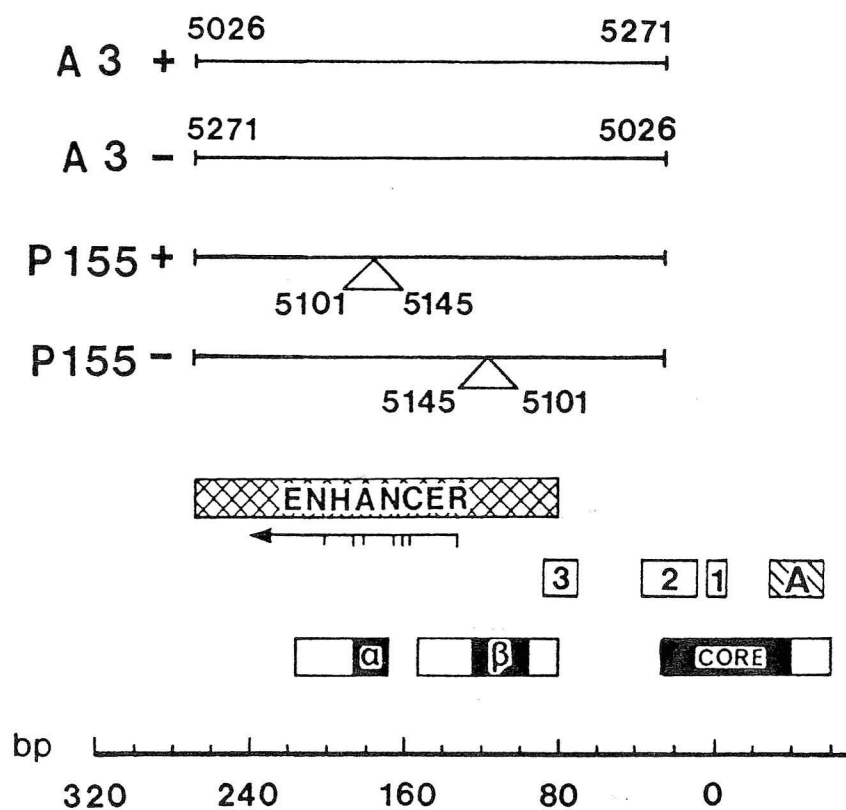
B. Recombinaison après transfection

Les ADN récoltés 5 jours après transfection ont été analysés comme décrit dans la légende de la figure 5B. Les rapports P/P+S obtenus par densitométrie et normalisés d'après le plus élevé sont les suivants:

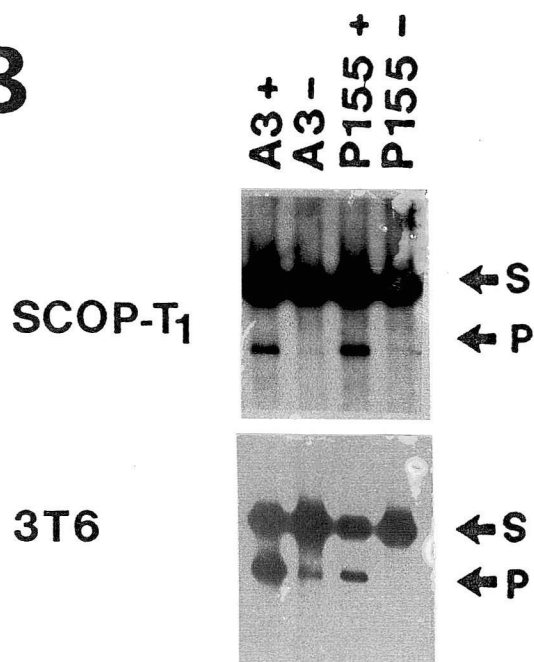
3T6: A3⁺ (100%), A3⁻ (3,3%), P155⁺ (59,4%), P155⁻ (1,8%)

scop-T1: A3⁺ (64,8%), A3⁻ (1,9%), P155⁺ (100%), P155⁻ (1,9%)

A



B



1) Co-transfection des 3T6 avec RmI et pPB21

Les cellules 3T6 ont été transfectées avec (par Pétri) 2 μ g de RmI et 0, 1, 2 et 4 μ g de pPB21 (Fig.7). Six jours après transfection, l'ADN de faible P.M. a été extrait, digéré par XbaI (XbaI introduit deux cassures rapprochées, à 2477 et 2522, chez Py), puis a été soumis à la même procédure que dans les sections précédentes.

En nous référant à la figure 7, nous pouvons voir que la conversion de RmI en P155 semble être affectée par la présence du co-transfectant. En l'absence de pPB21 (piste 1), nous avons un rapport P/P+S normalisé de 42,4%. Lorsque nous transfectons RmI avec 1, 2 ou 4 μ g de pPB21 (pistes 2-4), nous obtenons respectivement des rapports de 90,2%, 100% et 95,7%. Ce résultat semble indiquer que le co-transfectant apporte un élément en *trans* qui favorise la conversion de RmI. Cet élément pourrait être de nature protéique (ST, MT ou LT), ce qui appuierait l'hypothèse que les *scop*-T1 ne synthétisent pas assez de protéines précoces pour assurer la recombinaison des mutants.

2) Co-transfection des 3T6 avec Δ BT et pPB21

Encore une fois, les cellules 3T6 ont été transfectées avec une quantité constante de Δ BT (2 μ g) et des quantités croissantes de pPB21 (0, 1, 2 et 4 μ g). Les ADN ont été analysés comme dans la co-transfection précédente.

En examinant la figure 8, nous constatons que la co-transfection de Δ BT avec pPB21 suit exactement le même profil que celui obtenu avec RmI (Fig.7). RmI et Δ BT sont toutefois deux molécules capables de se répliquer dans les 3T6 et de recombiner dans les *scop*-T1 (et les 3T6), et c'est peut-être ce qui explique leur comportement

FIGURE 7: Co-transfection des 3T6 avec RmI et pPB21

Les 3T6 ont été transfectées avec, par Pétri de 10 cm, 2 μ g de RmI et 0 (piste 1), 1 (piste 2), 2 (piste 3) ou 4 μ g (piste 4) de pPB21. Après 6 jours d'incubation à 33°C, l'ADN de faible P.M. a été extrait des cellules et digéré avec XbaI (qui linéarise pPB21, RmI et P155), avant électrophorèse, transfert sur nylon et hybridation avec la sonde radioactive déjà utilisée (nt 4632 à 1192). La position du plasmide pPB21 co-transfectant (Co, 9,7 kb), de RmI (S, 7,1 kb) et de P155 (P, 5,3 kb) est indiquée par une flèche. Ici, le co-transfectant est à peine visible, ce qui peut s'expliquer par l'effet inhibiteur du vecteur pBR322 (Lusky et Botchan, 1981) sur la réplication de la molécule hybride. Les rapports P/P+S normalisés sont les suivants:

RmI + 0 μ g pPB21 (42,4%)

RmI + 1 μ g pPB21 (90,2%)

RmI + 2 μ g pPB21 (100%)

RmI + 4 μ g pPB21 (95,7%)

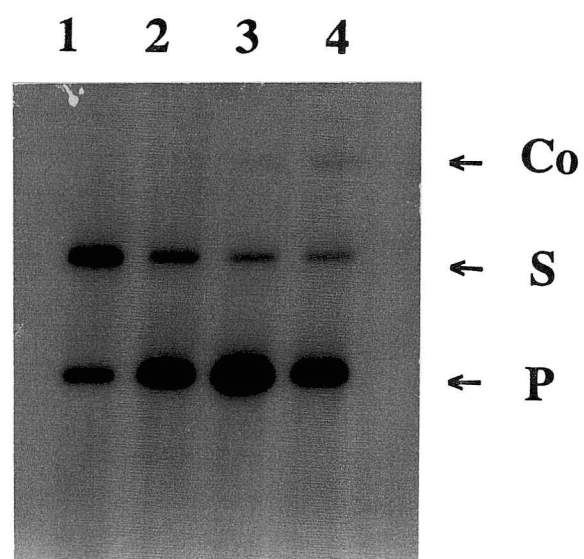
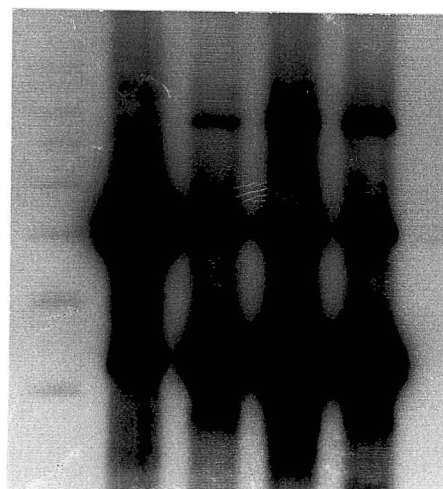


FIGURE 8: Co-transfection des 3T6 avec Δ BT et pPB21

Les cellules 3T6 ont été transfectées avec la combinaison Δ BT (2 μ g/Pétri) et pPB21 (0, 1, 2 ou 4 μ g par Pétri, pistes 1, 2, 3 et 4 respectivement). Après 6 jours d'incubation à 33°C, l'ADN de faible P.M. a été extrait des cellules et analysé comme décrit dans la légende de la figure 7. Co: pPB21 co-transfectant, S: Δ BT, P: P155 Δ BT. L: échelle de poids moléculaires.

L 1 2 3 4



← **Co**

← **S**

← **P**

similaire lors des expériences de co-transfection. Mais que se produit-il lorsque nous transfectons les 3T6 avec un mutant précoce de RmI ne codant pas pour les protéines précoces?

3) *Co-transfection des 3T6 avec Δ Pe et pPB21*

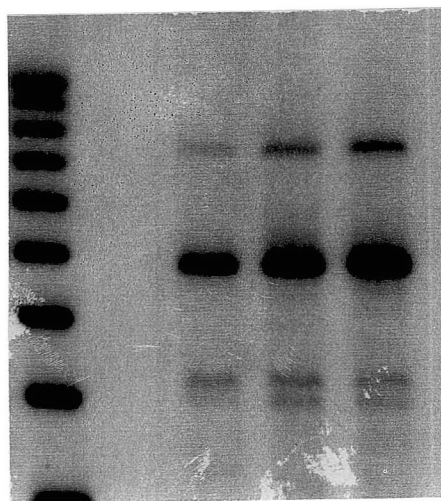
Les cellules 3T6 ont été transfectées avec une quantité constante de Δ Pe (2 μ g) et des quantités croissantes de pPB21 (0, 0,5, 1,5 et 2 μ g). Les ADN ont été analysés comme précédemment.

En examinant la figure 9, nous observons qu'en l'absence de co-transfectant, Δ Pe est incapable de se répliquer dans les 3T6 (piste 1), ce que nous savions déjà (Fig.5B). En présence de pPB21 (pistes 2-4), nous notons une bande à 9,7 kb correspondant au co-transfectant, une forte bande à 6,9 kb correspondant au substrat Δ Pe et une bande à 5,1 kb correspondant au produit de recombinaison P155 Δ Pe. Les protéines précoces fournies *en trans* par le génome A3 de pPB21 ont donc permis à Δ Pe de se répliquer efficacement et, en conséquence, de recombiner (faiblement). Contrairement à RmI et Δ BT, le pourcentage de conversion n'augmente pas avec la quantité de co-transfectant (les bandes S et P augmentent en proportion). Par ailleurs, nous notons la présence d'une bande inattendue à 5,3 kb dans les pistes 2, 3 et 4. Cet ADN comporte de toute évidence des séquences virales. Comment expliquer la présence d'une telle bande? Peut-elle provenir d'un événement de recombinaison chez pPB21, événement menant à la production d'ADN viral (A3) de longueur unitaire (5,3 kb)?

FIGURE 9: Co-transfection des 3T6 avec Δ Pe et pPB21

Les cellules 3T6 ont été transfectées avec la combinaison Δ Pe (2 μ g/ Pétri) et pPB21 (0, 0,5, 1,5 ou 2 μ g par Pétri, pistes 1, 2, 3 et 4 respectivement). Après 6 jours d'incubation à 33°C, l'ADN de faible P.M. a été extrait des cellules et analysé comme décrit dans les figures 7 et 8. Co: co-transfectant (9,7 kb), S: Δ Pe (6,9 kb), P: P155 Δ Pe (5,1 kb). L'étoile (*) indique la position d'un fragment d'environ 5,3 kb, comportant la région intergénique de Py (puisque'il se réplique et hybride avec la sonde virale) et pouvant être linéarisé par XbaI.

L 1 2 3 4



← Co

← S

↖ ↗ P*

La stratégie utilisée pour déterminer la provenance de cet ADN a été d'employer d'autres enzymes de restriction, puisque P155 possède quelques sites que A3 n'a pas. En utilisant l'enzyme XbaI, on s'attend à linéariser P155 et A3. En utilisant SmaI, on s'attend à linéariser P155 seulement. Voyons ce que nous avons obtenu en redigérant des échantillons préalablement analysés avec XbaI.

4) RmI et Δ BT: comparaison des traitements XbaI et SmaI/ClaI

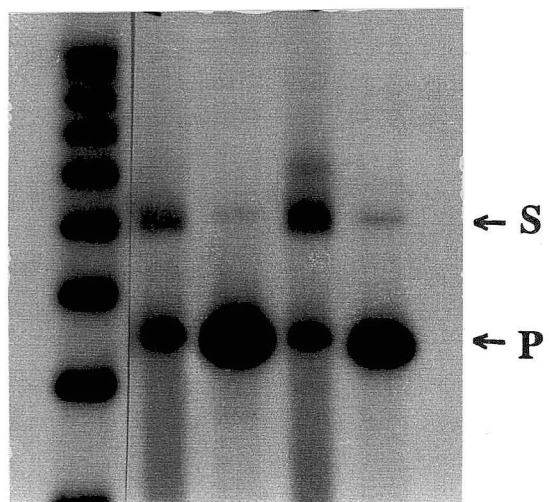
La figure 10 montre qu'en digérant par XbaI des échantillons de RmI et Δ BT (co-transfectés chacun avec 2 μ g de pPB21), nous linéarisons le co-transfectant (pPB21), le substrat (RmI ou Δ BT) et le produit (P155 ou P155 Δ BT, ou A3). En traitant ces mêmes échantillons par ClaI et SmaI, pPB21 est linéarisé par ClaI (site dans pBR322 au nt 24), RmI et Δ BT sont linéarisés par SmaI ainsi que P155 et P155 Δ BT, alors que A3 ne l'est pas. De toute évidence, la différence d'intensité entre la bande de 5,3 kb du traitement XbaI (pistes 2 et 4) et celle du traitement SmaI/ClaI (pistes 1 et 3) est due à la présence d'ADN viral de longueur unitaire ne possédant pas de site SmaI, donc possédant des séquences A3. Notons que la différence d'intensité de la bande S entre les échantillons traités par SmaI et ClaI (pistes 1 et 3) et ceux traités par XbaI (pistes 2 et 4), est due à la présence d'ADN A3 ne possédant ni site ClaI ni site SmaI, donc sous forme II (circulaire ouverte) co-migrant avec le substrat.

A la suite d'un tel résultat, nous nous devons de retraiter tous nos échantillons par ClaI et SmaI afin de vérifier si la co-transfection d'un ADN fournissant les protéines précoces en *trans* et d'un mutant de RmI peut vraiment stimuler la recombinaison chez

FIGURE 10: Co-transfection des 3T6 avec RmI + pPB21 et Δ BT + pPB21: comparaison des traitements XbaI et SmaI/ClaI

Les cellules 3T6 ont été transfectées avec 2 μ g/Pétri de RmI et pPB21 d'une part (pistes 1 et 2), et 2 μ g/Pétri de Δ BT et pPB21 d'autre part (pistes 3 et 4). Après 6 jours d'incubation à 33°C, l'ADN de faible P.M. a été extrait des cellules et digéré avec ClaI et SmaI (pistes 1 et 3) ou XbaI (pistes 2 et 4). Après digestion, l'ADN a été soumis à la procédure habituelle (voir figures précédentes). S: RmI ou Δ BT, P: P155 ou P155 Δ BT, ou A3.

L 1 2 3 4



ce dernier.

5) Redigestion des échantillons $\Delta BT + pPB21$ avec *SmaI* et *ClaI*

La figure 11 montre clairement qu'aucune augmentation du produit de recombinaison (P155 ΔBT) n'est associée à l'accroissement du co-transfectant, ce qui suggère que la très grande majorité des molécules de 5,3 kb sont composées, dans le cas des co-transfections, de séquences A3 et donc qu'elles proviennent de pPB21. Par ailleurs, l'expérience ayant été faite à 39°C (voir légende de la figure), température non permissive pour RmI et ses mutants, l'absence de bande S quand il n'y a pas de co-transfectant (piste 1) et la présence d'une forte bande dans les autres cas (pistes 2-4) prouvent l'efficacité de la co-transfection en ce qui concerne la complémentation de la réplication.

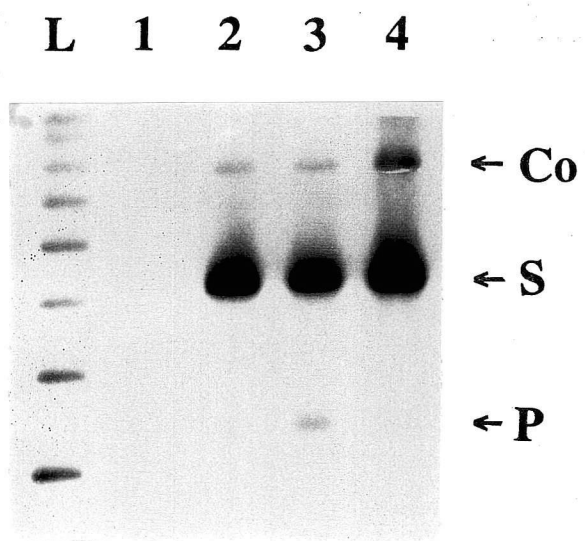
Les autres échantillons (RmI + pPB21 et $\Delta Pe + pPB21$) ont aussi été redigérés par *SmaI* et *ClaI* et des résultats similaires à ceux décrits ci-dessus ont été obtenus.

En conclusion, les expériences de co-transfection des cellules 3T6 et la transfection des cellules *scop*-T1 avec les mutants précoces de RmI montrent qu'on ne peut compléter pour la recombinaison intramoléculaire les modifications effectuées dans la région régulatrice. Par contre, l'expérience faite à 39°C (Fig.11) démontre que les protéines précoces fournies en *trans* par pPB21 suffisent amplement à compléter l'ADN substrat co-transfecté en ce qui concerne la réplication.

Toutefois, les expériences de co-transfection ont permis de mettre en évidence un phénomène assez intéressant: la production de génomes viraux à partir de pPB21.

FIGURE 11: Co-transfection des 3T6 avec Δ BT et pPB21

Les cellules 3T6 ont été transfectées avec Δ BT (2 μ g/Pétri) et pPB21 (0, 0,5, 1,5 et 2 μ g par Pétri, pistes 1, 2, 3 et 4 respectivement). Après 3 jours d'incubation à 39°C, l'ADN de faible P.M. a été extrait des cellules et digéré avec la combinaison enzymatique SmaI (qui linéarise Δ BT et P155 Δ BT) et ClaI (qui linéarise pPB21), puis analysé comme précédemment. S: Δ BT, P: P155 Δ BT.



D. Co-transfection des 3T6: production de génomes viraux de longueur unitaire

Pour comprendre un peu mieux le phénomène observé lors des co-transfections, nous avons d'abord voulu savoir s'il se produisait avec d'autres molécules que celles déjà utilisées.

Pour ce faire, nous avons utilisé l'ADN de trois souches de Py, soit les molécules B16-4 (P16 cloné au site BamHI de pBR322), *RtsP155* (révertant de P155 cloné au site SalI de pAT153; Gendron *et al.*, 1988) et pPB21 (A3 cloné au site BamHI de pBR322). P16 est une souche Py de type sauvage (Diamond et Crawford, 1964) de laquelle le mutant *tsP155* a été dérivé (Eckhart, 1969).

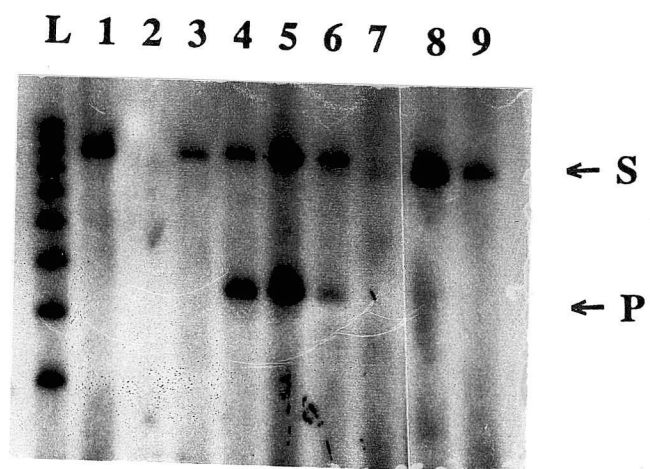
Les cellules 3T6 ont été transfectées soit avec chaque molécule séparément, soit avec des combinaisons de deux molécules (B16-4/*RtsP155*, B16-4/pPB21 et *RtsP155*/pPB21). Six jours après transfection, l'ADN de faible P.M. a été extrait des cellules et digéré par les enzymes XbaI (tous les ADN sont linéarisés par XbaI) ou SmaI (SmaI linéarise les ADN de souche P16 et P155). L'ADN a par la suite été analysé comme décrit précédemment.

L'analyse de la figure 12 nous révèle que la transfection des 3T6 avec chacune des constructions (pistes 1, 2 et 3) ne mène pas à un événement de recombinaison (absence d'une bande à 5,3 kb). Les pistes 4 et 5, où les cellules ont été co-transfectées avec le mélange B16-4/*RtsP155*, montrent clairement qu'il y a production d'ADN viral migrant à 5,3 kb. Toutefois, les traitements enzymatiques utilisés ne permettent pas de déterminer la nature de cet ADN, P16 ou P155.

Lorsque nous co-transfectons les 3T6 avec le mélange pPB21/*RtsP155*, nous

FIGURE 12: Effet de la position du site de clonage sur la production d'ADN viral de longueur unitaire dans les expériences de co-transfection

Les 3T6 ont été transfectées d'une part avec l'ADN cloné de trois souches de Py, soit les molécules B16-4 (9,8 kb, piste 1), *RtsP155* (9,0 kb, piste 2) et pPB21 (9,7 kb, piste 3), et d'autre part avec un mélange de deux ADNs, soit B16-4/*RtsP155* (pistes 4 et 5), pPB21/*RtsP155* (pistes 6 et 7) et B16-4/pPB21 (pistes 8 et 9). Après 6 jours à 33°C, l'ADN de faible P.M. a été extrait des cellules et digéré avec *XbaI* (pistes 1-4, 6 et 8) et *SmaI* (pistes 5, 7 et 9), puis a été soumis à la procédure habituelle. La position des différents substrats (S) et produits (P) est indiquée par une flèche. Notons que la molécule *RtsP155* est fortement handicapée dans sa réplication (piste 2), mais que cela n'empêche pas la formation du produit dans les co-transfections (pistes 4-6).



obtenons un résultat différent du précédent. Le traitement XbaI met en évidence une bande à 5,3 kb (piste 6) alors que cette bande est absente avec le traitement SmaI (piste 7). La présence d'un site XbaI (plus précisément de deux sites XbaI très rapprochés, nt 2477 et 2522) et l'absence du site SmaI nous porte à croire que cet ADN viral de 5,3 kb est plutôt de souche A3 (du moins en partie).

La dernière co-transfection, impliquant pPB21 et B16-4, a donné un résultat particulièrement intéressant; c'est-à-dire l'absence d'une bande à 5,3 kb (pistes 8 et 9). Nous nous sommes alors demandé ce qui rapprochait ce dernier résultat des transfections simples.

Le seul point commun est que pPB21 et B16-4 sont deux constructions où l'ADN viral (A3 et P16 respectivement) est interrompu au niveau du site BamHI par la séquence plasmidique. En d'autres termes, lorsque nous transfectons les 3T6 avec pPB21 (piste 3), toutes les molécules d'ADN Py introduites dans les cellules sont clonées au même site de restriction, dans le cas présent BamHI. Lorsque nous co-transfectons les 3T6 avec le mélange pPB21/B16-4, ici aussi, toutes les molécules introduites dans les cellules sont clonées au même site de restriction, BamHI.

Cette hypothèse explique bien le résultat obtenu avec le mélange pPB21/RtsP155: pPB21 est une molécule A3 clonée au site BamHI de pBR322 et RtsP155, un P155 révertant cloné au site SalI de pAT153. Ainsi, la région virale interrompue chez l'une des molécules par les séquences plasmidiques est continue chez l'autre molécule. Le même raisonnement s'applique à la combinaison B16-4/RtsP155. Deux ADN Py clonés en différents sites peuvent donc mener, lors d'une co-transfection, à la production d'ADN

viral de longueur unitaire. Cette production semble être biaisée puisque, dans le cas des co-transfections avec pPB21, le produit de recombinaison ne possède jamais de site SmaI, présent dans au moins un des deux protagonistes, B16-4 ou RtsP155.

Enfin, nous comprenons mieux pourquoi les expériences de co-transfection des 3T6 avec RmI (ou les différents mutants de RmI) et pPB21 ont donné de tels résultats: nous étions en présence d'un génome A3 interrompu à BamHI (nt 4632) et d'un génome P155 interrompu à 3092 par de l'ADN cellulaire (RmI ou un de ses mutants; Fig.2), un mélange idéal pour mener à la production d'ADN viral de longueur unitaire dépourvu d'un site SmaI (voir Discussion).

A ce stade des expériences, il a été décidé que la recombinaison intermoléculaire que j'avais ainsi détectée présentait suffisamment d'intérêts pour fournir un sujet de maîtrise. Ce projet particulier est donc maintenant celui de M. Louis-Charles Fortier.

E. Recombinaison chez RmI: processus conservatif ou non conservatif

Dans le laboratoire du Dr Bourgaux, nous avons d'abord étudié la recombinaison homologue dans des conditions permettant la détection d'un seul produit de recombinaison: lorsque RmI recombine, un seul des deux produits formés est détecté, Py (P155); IR, son réciproque (Fig.2), est dépourvu d'une origine de réplication; dès lors, même s'il est formé par recombinaison, il ne peut s'amplifier et est ainsi non détectable. Donc, pour pouvoir observer le produit réciproque, nous nous devons de construire des dérivés de RmI contenant une origine de réplication supplémentaire dans la séquence IR (Ins + une répétition S).

En introduisant la région intergénique de Py au niveau de Ins chez RmI (Construction des ADN plasmidiques), nous insérons, en plus d'une origine, une seconde région d'homologie d'environ 1500 pb (Fig.13). De cette façon, la molécule précurseur peut maintenant subir deux événements de recombinaison distincts: une recombinaison impliquant les répétitions S (SR) et une recombinaison impliquant les grandes homologies (LR). La figure 14A montre clairement que la SR peut générer, non pas un, mais deux produits amplifiables (Py ou T pour "top", et B pour "bottom"), un seul pouvant diriger la synthèse des protéines virales précoces (T). Afin de compenser pour les différences dans la capacité à coder pour les protéines précoces, nous avons transfecté les réplicons non seulement dans les cellules 3T6 mais aussi dans les cellules *scop*-T1, ces dernières pouvant assurer la réplication de produits incapables de coder pour les protéines précoces. Dans les sections qui suivent, seuls les résultats obtenus avec les *scop*-T1 seront montrés puisque des résultats identiques ont été obtenus avec les 3T6. Notons qu'une telle similitude semble indiquer que les protéines virales précoces fournies par les *scop*-T1 ne sont requises pour la formation d'aucun des produits de recombinaison.

1) Transfection avec O(5022,-)/RmI: la SR donne le produit T, parfois le produit B

Nous avons utilisé ici le réplicon contenant l'insert 5022-1192 orienté de façon inverse à la séquence correspondante chez RmI (Fig.14A). La question est de savoir si la transfection des *scop*-T1 avec O(5022,-)/RmI donne, par recombinaison, non seulement Py, ou T, mais aussi le produit réciproque, ou B. Pourquoi utiliser le mutant (-) plutôt que le mutant (+)? Tout simplement pour éviter une compétition possible entre

FIGURE 13: Carte physique de O(5022,+)/RmI et O(4633,+)/RmI

O(5022,+)/RmI (8,6 kb) et O(4633,+)/RmI (9,0 kb) sont des dérivés de RmI comportant deux régions intergéniques Py. Les fragments introduits au niveau du site BglII de l'Ins s'étendent des pb 5022 à 1192 (1466 pb) pour O(5022,+)/RmI, et de 4633 à 1192 (1855 pb) pour O(4633,+)/RmI. Le signe + signifie que l'insert est orienté de façon directe par rapport à la séquence correspondante chez RmI. La symbolique est la même que celle de la figure 2, avec l'ADN viral en noir, l'Ins quadrillé, les répétitions S1 et S2 sous forme de têtes de flèches. B: BamHI, Bg: BglII, E: EcoRV, S: SalI. e: région virale précoce, l: région tardive. O: origine de réplication.

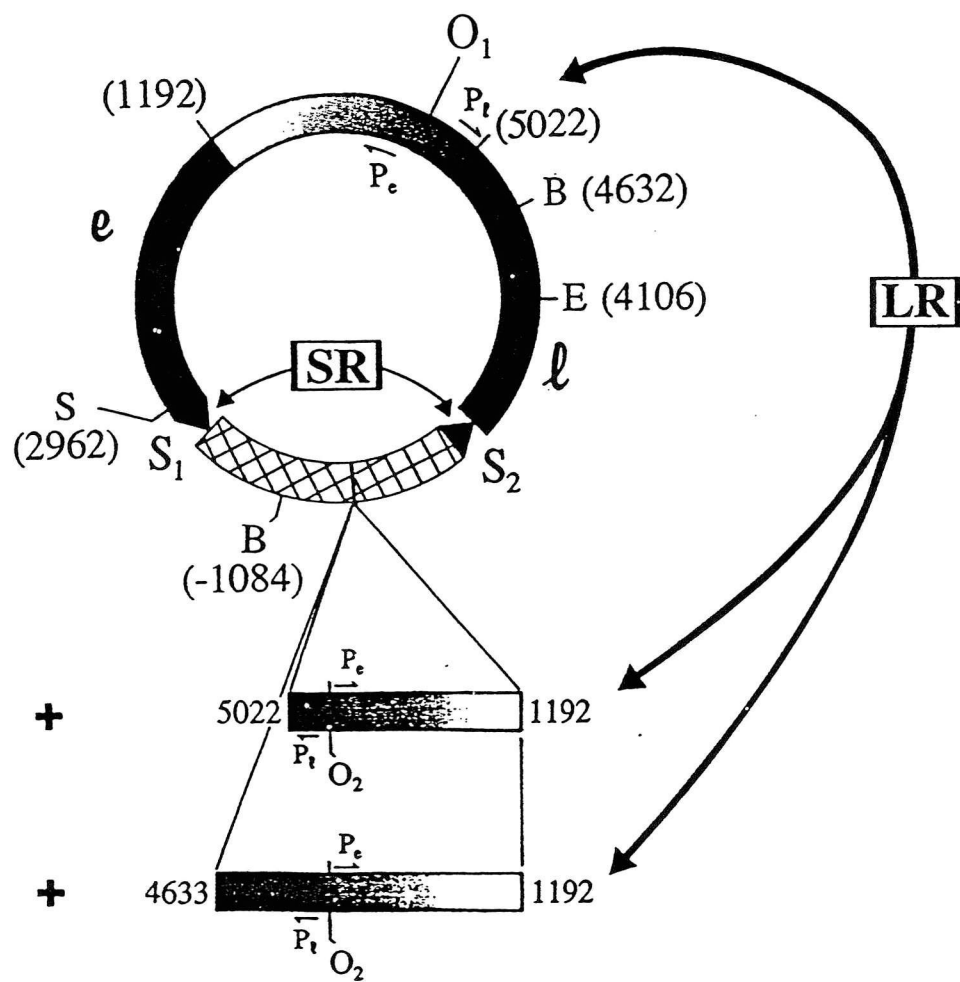


FIGURE 14: Recombinaison chez RmI et O(5022,-)/RmI

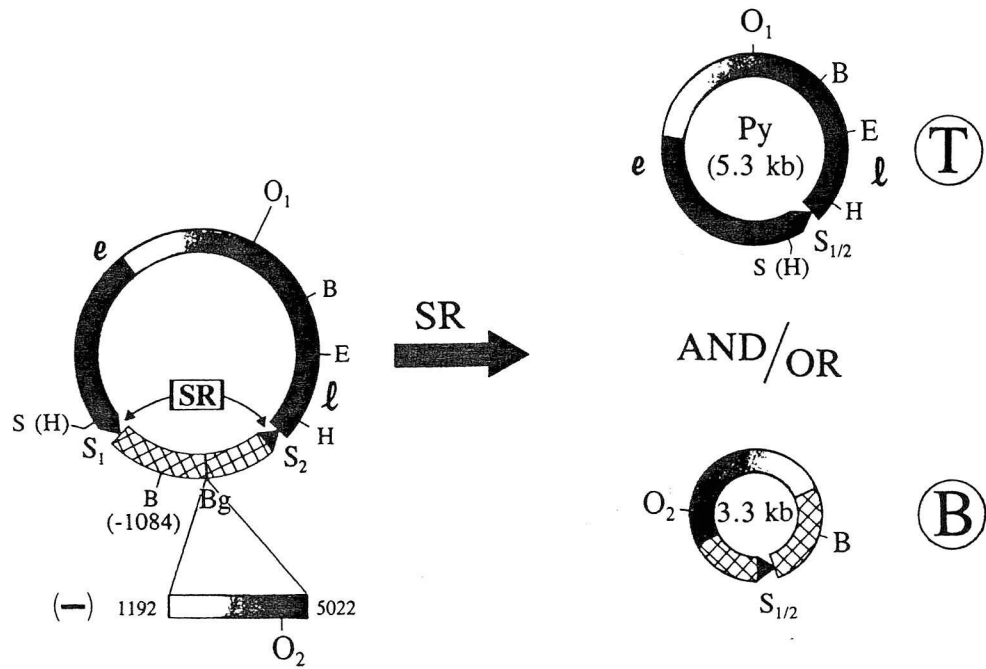
A. Carte physique de O(5022,-)/RmI et des produits de recombinaison possibles

O(5022,-)/RmI (8,6 kb) contient la même région intergénique additionnelle que O(5022,+)/RmI (Fig.13), mais orientée de façon inverse. Seule donc la SR est théoriquement possible chez cette molécule, les deux produits réciproques, T et B, ayant chacun une origine de réplication (O1 ou O2). S 1/2 est là pour indiquer que nous ne savons pas où se fait la recombinaison à l'intérieur des répétitions S. B: BamHI, Bg: BglIII, E: EcoRV, S:SalI, H:HincII. e: région virale précoce, l: région tardive.

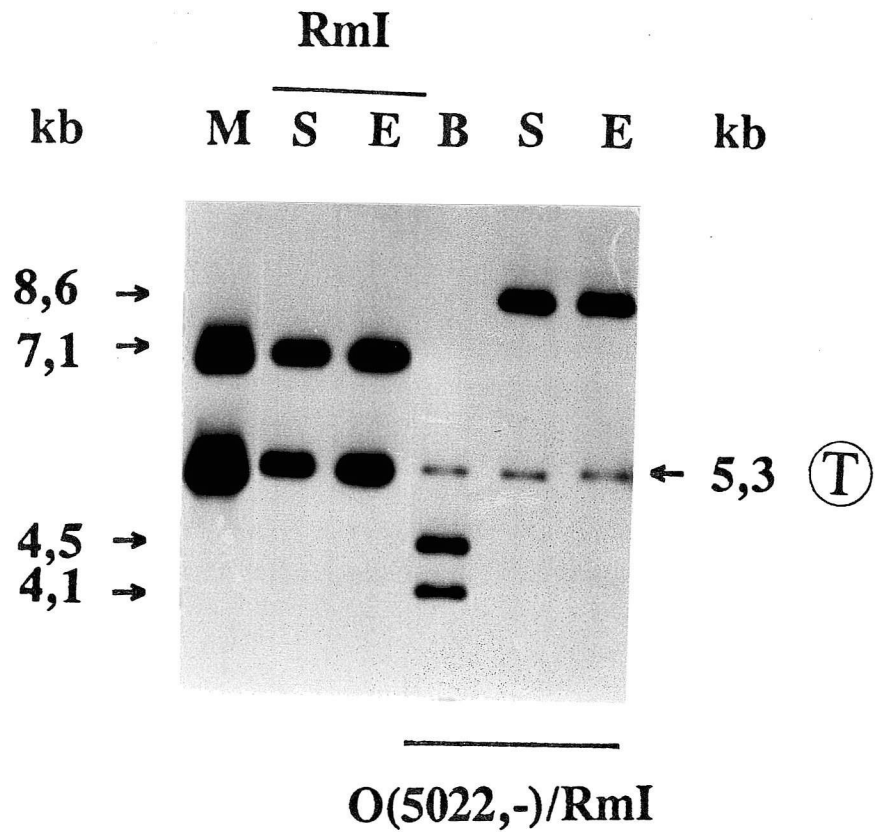
B. Transfection des scop-T1 avec RmI et O(5022,-)/RmI

6 jours après transfection (33°C), l'ADN de faible P.M. a été extrait des cellules et digéré avec l'un des enzymes suivants: SalI (S), EcoRV (E) ou BamHI (B), avant électrophorèse, transfert sur nylon et hybridation avec la sonde habituelle (fragment viral 4632-1192). SalI et EcoRV linéarisent le substrat et le produit T; l'enzyme BamHI introduit deux cassures chez le substrat, générant deux fragments de 4,5 et 4,1 kb; BamHI linéarise aussi les deux produits T et B (panneau A). M: marqueur de poids moléculaires composé de RmI (7,1 kb) et P155 (5,3 kb) linéaires.

A



B



les produits provenant de la LR et de la SR. Avec l'orientation (-), nous empêchons théoriquement la LR de générer les produits attendus (L pour "left" et R pour "right") et favorisons ainsi la détection des produits T et B (Fig.14A).

Les cellules *scop*-T1 ont été transfectées avec RmI ou O(5022,-)/RmI et les ADN analysés comme précédemment. La figure 14B montre clairement que, dans tous les cas, le seul produit détecté est Py, ou T (pistes 2 à 6). Avec O(5022,-)/RmI, le réciproque de Py (B = 3,3 kb), qui est linéarisable par BamHI, est absent (piste 4).

2) Transfection avec O(4633,+)/RmI: la LR et la SR génèrent des quantités équivalentes des deux produits de recombinaison

Comme nous venons de le mentionner, pour étudier la LR, nous devons absolument travailler avec des constructions plasmidiques portant des séquences répétées orientées de façon directe. Toutefois, l'utilisation de O(5022,+)/RmI pour cette étude n'est pas très appropriée puisque les produits de recombinaison et les fragments du substrat co-migrent après digestion avec BamHI. BamHI linéarise les produits L (4,5 kb) et R (4,1 kb) et introduit deux cassures chez le substrat donnant des fragments de 4,5 kb et 4,1 kb également (Fig.14B). C'est pourquoi nous avons construit un autre dérivé de RmI, soit O(4633,+)/RmI (Fig.13), avec lequel le problème de co-migration ne se pose pas. Comme O(5022,+)/RmI, O(4633,+)/RmI peut subir deux événements de recombinaison distincts menant à la production possible de quatre produits de recombinaison encore désignés T, B, L et R (Fig.15A). Des quatre produits possibles, deux codent pour les protéines précoces, soit T et L. Les tailles attendues des produits

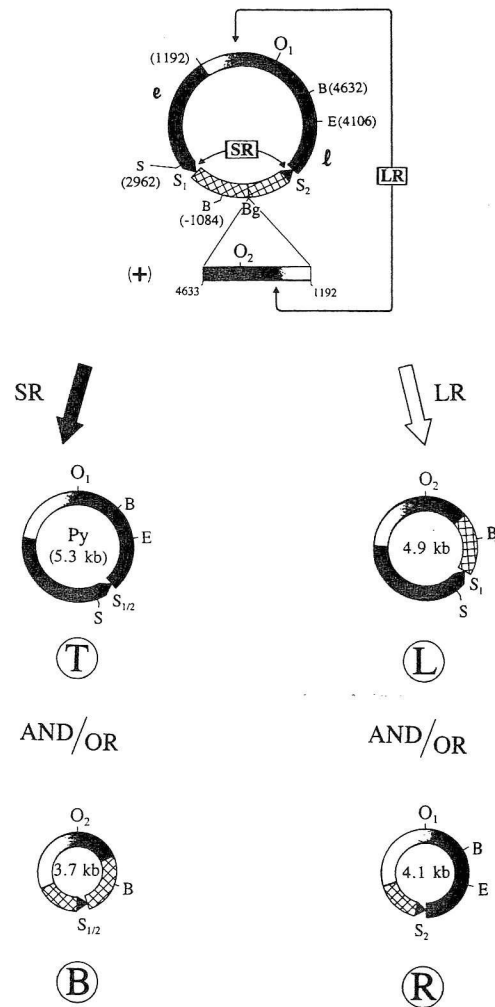
FIGURE 15: Recombinaison chez O(4633,+)/RmI et son mutant $\Delta O2$ *A. Substrats et produits possibles*

La description de O(4633,+)/RmI a déjà été faite à la figure 13. Rappelons que le mutant $\Delta O2$ est un dérivé de O(4633,+)/RmI ayant une O2 inactive pour la réplication (Construction des ADN plasmidiques). Sont indiqués par des flèches les sites impliqués dans la SR et la LR. Pour ce qui est de la LR, nous avons choisi comme site de "crossing-over" un point situé à mi-chemin entre l'origine de réplication et la pb 1192, même si nous savons que le "crossing-over" peut se produire n'importe où dans la région d'homologie (voir texte). Notons que chacun des quatre produits attendus (B, T, L et R) possède une origine fonctionnelle (sauf B dans le cas de $\Delta O2$). De plus, deux des quatre produits possèdent une région précoce intacte, soit T et L. B: BamHI, Bg: BglII, E: EcoRV, S: SalI. e: région virale précoce, l: région tardive.

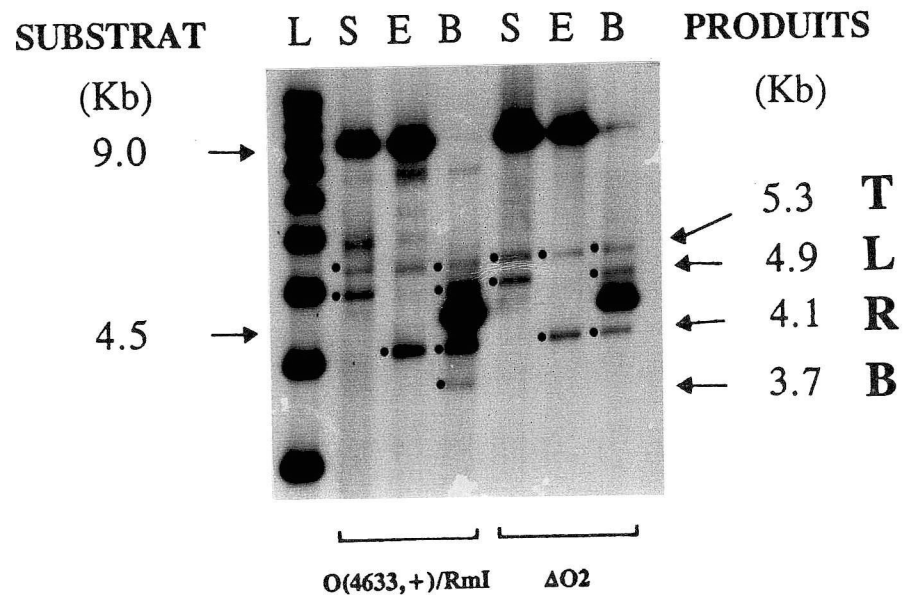
B. Recombinaison chez O(4633,+)/RmI et $\Delta O2$ dans les scop-T1

Les scop-T1 ont été transfectées avec O(4633,+)/RmI et $\Delta O2$. Après 6 jours d'incubation à 33°C, l'ADN de faible P.M. a été extrait des cellules et digéré avec l'un des enzymes suivants: SalI(S), EcoRV (E) et BamHI (B), avant l'analyse habituelle. SalI linéarise le substrat et les produits T et L, EcoRV linéarise le substrat (9,0 kb) et les produits T et R. L'enzyme BamHI introduit deux cassures chez le substrat, donnant des fragments qui co-migrent à 4,5 kb, et linéarise les quatre produits attendus (T, B, L et R).

A



B



L et R sont 4,9 kb et 4,1 kb respectivement, tandis que les deux fragments BamHI du substrat co-migrent à 4,5 kb (Fig.15B, pistes 1-3). Le traitement BamHI (piste 3) met en évidence les quatre produits attendus. Pour la LR et la SR, nous observons des quantités équivalentes des produits réciproques (L et R d'une part, T et B d'autre part). La grande reproductibilité de cette observation indique qu'il n'y a pas de biais dans la SR ou la LR chez O(4633,+)/RmI, alors que chez O(5022,-)/RmI, la formation du produit B n'est pas quelque chose de très reproductible. Par ailleurs, les deux produits étant présents aussi bien pour la SR que pour la LR, il n'est pas possible de trancher entre conservatif et non conservatif. Ces différents éléments seront repris dans la Discussion (voir aussi section suivante).

Enfin, la quantification de chacun des quatre produits de recombinaison (non montré), et ce pour plusieurs expériences, semble indiquer qu'il n'existe aucun rapport entre la taille de l'homologie impliquée et la quantité de produit obtenu (par exemple, certaines expériences ont donné autant de produits SR que de produits LR, alors que la taille des homologies impliquées diffère d'un facteur dix). De tels résultats ne peuvent s'expliquer qu'en admettant que la recombinaison est influencée par un processus cellulaire quelconque, et que la SR et la LR réagissent différemment à cette influence.

3) Une molécule mutante avec une O2 défectueuse donne les deux produits de la LR

L'expérience de transfection des fragments HincII de O(5022,-)/RmI, chacun portant une origine de réplication (Nault *et al.*, 1994b), a clairement montré la fonctionnalité de O2 au point de vue de la réplication, et malgré cela, le produit B est

parfois présent, parfois absent chez O(5022,-)/RmI. Pour expliquer cette anomalie, nous pouvons supposer que l'origine de réplication (ou la région intergénique) exerce un rôle dans la recombinaison autre que la réplication, et que O2 ne peut exercer ce rôle pour une raison quelconque (influence de l'environnement -Ins- par exemple). Si cela était vrai, cet effet pourrait théoriquement être ressenti au niveau de la LR également. Il devenait donc intéressant de savoir avec quel produit de recombinaison (L ou R) se retrouvait O2, afin de voir si O2 influence également la recombinaison LR. Une façon facile d'identifier l'origine (O1 ou O2) se retrouvant dans un produit de recombinaison est d'inactiver l'autre origine. Dans le cas présent, nous avons inactivé l'origine minimale de O2 pour générer un dérivé de O(4633,+)/RmI appelé $\Delta O2$ (Construction des ADN plasmidiques).

Pour s'assurer que la modification apportée à O2 l'a bel et bien inactivée au point de vue réplcatif, nous avons effectué une expérience de reconstitution où des fragments HincII, correspondant à quelques nt près aux produits de recombinaison SR attendus, ont été introduits sous forme circulaire dans les cellules *scop*-T1. La figure 16B montre clairement que la seule différence entre les fragments provenant de O(5022,+)/RmI, O(4633,+)/RmI et $\Delta O2$, c'est que le fragment "B" de $\Delta O2$, faisant 4,2 kb, ne se réplique pas.

Suite à cette vérification, les cellules *scop*-T1 ont été transfectées avec O(4633,+)/RmI et $\Delta O2$. La figure 15B permet de comparer aisément les deux patrons de recombinaison. Nous notons une seule différence: $\Delta O2$ ne donne pas le produit B, résultat que nous attendions puisque sans une O2 active, B ne peut pas se répliquer. La

FIGURE 16: Fonctionnalité des origines de réplication chez les mutants de la série O/RmI

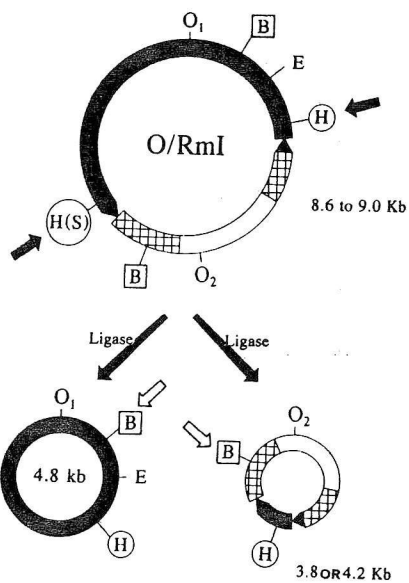
A. Représentation schématique de l'essai

Trois mutants de la série O/RmI [O(5022,+)/RmI, O(4633,+)/RmI et Δ O2] sont soumis à une digestion HincII (H) qui scinde le substrat en deux fragments, chacun comportant une origine de réplication (O1 ou O2). Les fragments sont ensuite circularisés par ligation et co-transfectés dans les *scop-T1*. B: BamHI, E: EcoRV, S: SalI.

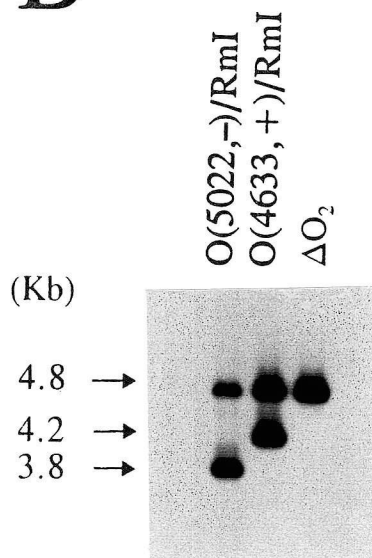
B. Transfection des scop-T1 avec les fragments HincII circularisés

L'ADN de petit P.M. a été extrait des cellules après 6 jours d'incubation à 33°C, digéré par BamHI, qui linéarise chacun des fragments HincII (panneau A), et analysé selon la procédure habituelle. Notons que le fragment de 4,8 kb, comportant O1 et correspondant au produit de recombinaison T, est commun aux trois mutants et détecté pour chacun d'eux. Le fragment comportant O2 et correspondant au produit de recombinaison B fait 3,8 kb ou 4,2 kb selon le substrat utilisé. Ce fragment est absent avec Δ O2, résultat confirmant l'efficacité de l'inactivation de l'origine par la mutation introduite (Matériel et Méthodes).

A



B



présence en quantité égale des produits L et R prouve par ailleurs que la recombinaison se produit parfois à gauche, parfois à droite de O1 (ou O2). Si le "crossing-over" se faisait toujours au même endroit, l'un des deux produits de la LR, celui qui contient l'O2 inactivée, serait forcément absent. La LR fait donc intervenir des sites aléatoires de recombinaison. Ce résultat souligne une différence sans doute importante entre la LR, qui se produit entre deux grandes homologues contenant chacune une région intergénique, et la SR, qui est "ciblée" au niveau des répétitions S. A cette étape, nous pouvons qualifier l'événement de recombinaison LR d'aléatoire et donc *non sélectif*, mais nous ne pouvons toujours pas dire si le mécanisme est conservatif ou non conservatif. Dans le cas de $\Delta O2$, que chaque événement de recombinaison donne les deux produits (mécanisme conservatif) ou qu'il donne soit l'un soit l'autre (mécanisme non conservatif), sur l'ensemble des événements, l'origine fonctionnelle O1 va se retrouver tantôt chez L tantôt chez R. Enfin, nous pouvons dire que la réplication à partir de l'origine O2 n'est nécessaire ni pour la LR ni pour la formation du produit T.

Pour déterminer si la LR est conservative ou non conservative, nous avons construit différents dérivés de O(4633,+)/RmI ayant des modifications au niveau des régions régulatrices bordant O1 et/ou O2. Si nous arrivons à faire disparaître un des deux produits de la LR sans affecter leur capacité à se répliquer, c'est que la LR, tout comme la SR, dépend de l'intégrité des régions régulatrices de la transcription. C'est le mutant DM qui a éclairé ce point.

4) La LR, un processus non conservatif

Des résultats obtenus par Angèle Fricker (mémoire de maîtrise, 1994) ont montré que des mutations simples au niveau du Pe ou du Pl bordant O1, chez O(4633,+)/RmI, n'affectent que la production de T (B, L et R sont présents). Les mêmes mutations transférées à la région O2 ont donné des résultats beaucoup moins clairs (voir Discussion). Puisqu'aucun des mutants simples ne semblait avoir une LR affectée, nous avons décidé de construire un double mutant -DM- et dans ce but, nous avons transféré les mutations ΣT et Pl⁻ chez O(4633,+)/RmI, au niveau des régions bordant O1 et O2 respectivement (Fig.17A).

La figure 17B permet de comparer les patrons de recombinaison de O(4633,+)/RmI (ou WT), de $\Delta O2$ et de DM. La transfection et l'analyse des ADN ont été effectuées selon la procédure habituelle. Là encore, l'unique différence entre WT et $\Delta O2$ concerne le produit B (B est absent chez $\Delta O2$). La mutation $\Delta O2$ n'affecte aucunement la LR. Il en va tout autrement avec DM. Le traitement BamHI met en évidence les produits B et R, et le traitement EcoRV confirme la présence de R, mais les produits T et L sont absents. Trois conclusions peuvent être tirées de ce résultat. Premièrement, et comme confirmation de ce que nous avons déjà observé (Fig.5B), la mutation ΣT près de O1 inhibe la formation de Py (ou produit T) par recombinaison SR. Deuxièmement, la mutation Pl⁻ près de O2 n'empêche pas la formation du produit B, lui aussi généré par la SR. Rappelons qu'une telle mutation inhibait la conversion de RmI en P155 (Fig.6B). Une modification dans un des promoteurs viraux, - en tout cas dans le Pl - pourrait donc ne pas avoir la même influence sur la SR, selon qu'elle est située près de O1 ou près de O2. Troisièmement, la LR est manifestement non conservative

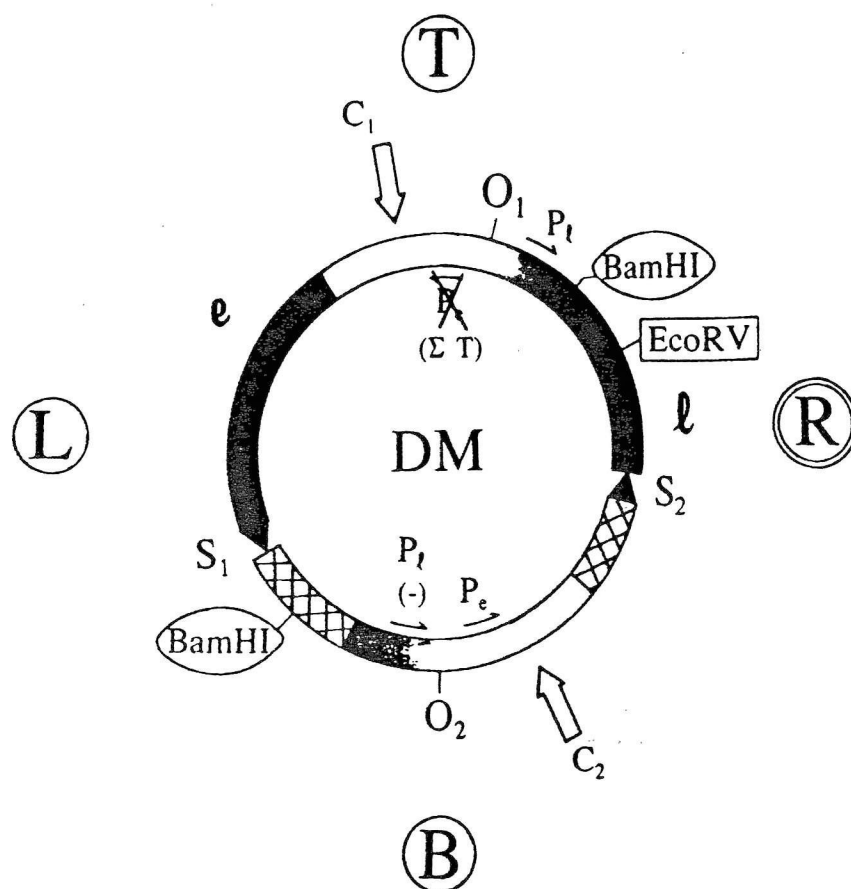
FIGURE 17: Recombinaison chez le double mutant DM*A. Carte physique de DM*

DM est un mutant de O(4633,+)/RmI qui diffère de ce dernier en deux points: la substitution ΣT dans la région promotrice précoce bordant O1 ainsi que l'inversion du promoteur tardif, Pl⁻, dans la région bordant O2. Les sites potentiels de "crossing-over" pour la LR sont indiqués par des flèches (C1 et C2). DM, tout comme O(4633,+)/RmI, peut subir la SR et la LR, et une fois de plus quatre produits peuvent être générés par recombinaison: T, B, L et R. Noter que BamHI linéarise les 4 produits (et clive le substrat en 2 fragments co-migrant à 4,5 kb), tandis que EcoRV linéarise les produits T et R.

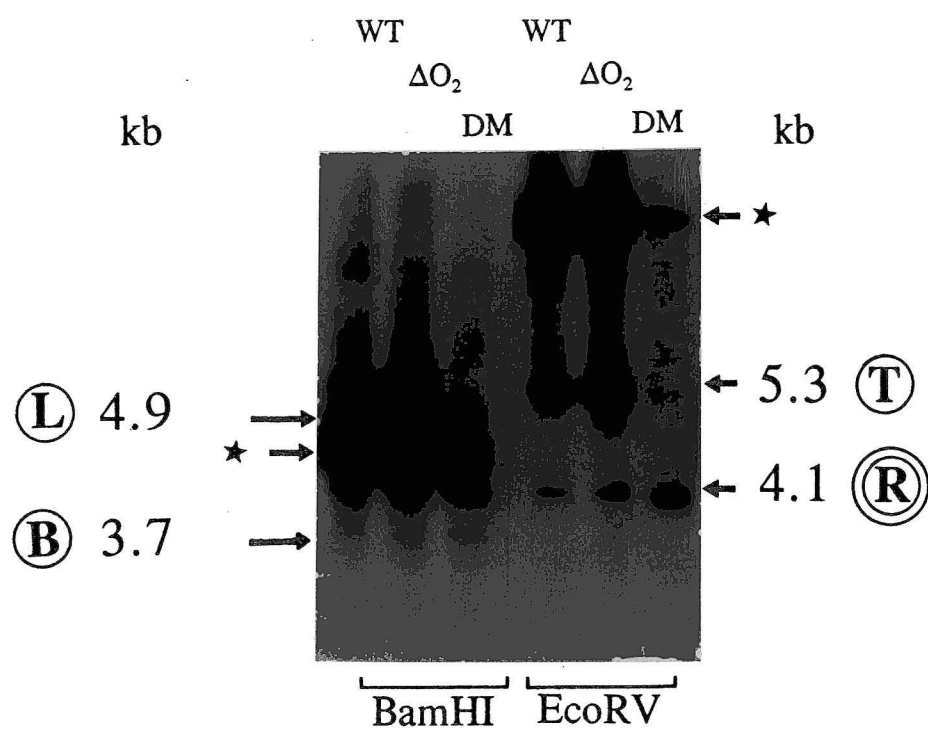
B. Transfection des scop-T1 avec O(4633,+)/RmI, $\Delta O2$ et DM

Après 6 jours d'incubation à 33°C, l'ADN de faible P.M. a été extrait des cellules et digéré avec BamHI ou EcoRV, avant d'être analysé comme à l'habitude. Les molécules contrôles, WT et $\Delta O2$, se comportent ici comme dans l'expérience précédente (Fig.15B). Avec DM, seuls les produits R (4,1 kb) et B (3,7 kb) sont détectés. Les fragments du substrat (9,0 kb dans le cas de EcoRV, 4,5 kb dans le cas de BamHI) sont indiqués par des étoiles.

A



B



puisque, dans le cas de DM, le produit L est complètement absent. Ce qui est moins clair, par contre, c'est la raison de sa disparition. D'autres mutants, simples et doubles, de O(4633,+)/RmI ont permis d'apporter quelques lumières sur la question (voir Discussion).

F. Relation entre la transcription et la recombinaison SR

Les résultats des sections A et B montrent clairement que certaines altérations du promoteur précoce (ΔPe , ΣT , ΔTC et ΔBTC) ou du promoteur tardif ($P155^-$ et $A3^-$) affectent grandement la SR. Pour sa part, la délétion ΔBT a un effet beaucoup moins important. L'analyse de ces résultats nous a bien sûr fait penser à une relation entre la transcription et la recombinaison SR. Le cheminement emprunté pour arriver à une telle affirmation est le suivant. Premièrement, puisque ΔBT est le seul mutant précoce apte à se répliquer (et à recombiner) dans les 3T6 (Fig.5B) - donc le seul à avoir une région précoce capable d'assurer la production de protéines fonctionnelles - il est tentant d'attribuer à la transcription précoce une fonction régulatrice dans le mécanisme SR. Pourquoi la transcription précoce plutôt que la réplication? Tout simplement parce que, dans les *scop*-T1, où tous les mutants sont parfaitement capables de se répliquer grâce au LT fourni en *trans* par les cellules, seul ΔBT recombine. Deuxièmement, puisque les mutants Pl^- ne subissent pas la SR (Fig.6B), alors qu'ils sont parfaitement capables de se répliquer dans les 3T6, nous sommes aussi tentés d'attribuer à la transcription tardive une fonction régulatrice dans la SR. Un modèle essayant d'expliquer la relation transcription-recombinaison chez RmI a été publié en même temps que nos résultats

concernant les mutants précoces et tardifs (Nault *et al.*, 1994a).

Mais avant de conclure que la SR repose sur un mécanisme régulé par la transcription précoce et la transcription tardive, nous nous devons d'étudier cette dépendance possible à l'aide d'une technique d'analyse de la transcription puisque, jusqu'à ce stade-ci, les indices que nous possédions étaient obtenus de façon plutôt circonstancielle. Nous avons débuté cette étude par la construction de nouveaux mutants.

1) ΣT bis: construction et transfection

ΔBT et ΣT sont deux mutants précoces de RmI différant l'un de l'autre par l'absence, chez ΔBT , du site B de liaison à LT (aucun n'a de boîte TATA, Fig.5A). La transfection des cellules 3T6 avec chacun des mutants (Fig.5B) révèle que ΔBT est capable de se répliquer et que ΣT en est incapable. Comment expliquer que ΔBT se réplique dans les 3T6 et que ΣT ne s'y réplique pas alors que ce dernier n'a rien de moins que le premier? Il y a au moins deux explications possibles. La première suppose que la délétion (ou la substitution) de la boîte TATA peut à elle seule affecter la transcription et donc la synthèse des protéines précoces, mais que la délétion du site B annulerait cet effet. La seconde suppose que la transcription précoce n'est nullement affectée par la mutation ΣT , mais que les protéines virales sont non fonctionnelles (tronquées ou mutées). Alors que nous ne disposons d'aucun élément pour appuyer la première hypothèse, nous devons nous remémorer que les mutants précoces et tardifs ont été fabriqués en partie par PCR (plus précisément le fragment KpnI-A allant de 4693 à 2176; Construction des ADN plasmidiques). Une grande partie de la région précoce a

donc été synthétisée de cette façon. Il n'est pas impossible qu'il y ait eu erreur de lecture lors de la réaction PCR, erreur pouvant mener soit à la production d'une protéine tronquée par introduction d'un codon stop, soit à la formation d'une protéine non fonctionnelle dans la réplication à cause d'une substitution d'un ou plusieurs acides aminés. Séquencer la région précoce de ΣT pour vérifier la présence de tels changements pouvait se révéler fastidieux et décevant. Nous avons donc décidé de refaire un ΣT en substituant le segment MluI-SmaI couvrant la région précoce de ce mutant par le segment correspondant de ΔBT . Le site SmaI est situé au nt 2990 tandis que le site MluI se trouve au niveau de la mutation, ΣT ou ΔBT (Construction des ADN plasmidique et Fig.5A). Nous nous assurons de cette façon d'avoir une région codante précoce fonctionnelle puisque ΔBT est autonome pour la réplication. La molécule résultante a été nommée ΣT_{bis} , puisqu'elle possède la mutation ΣT et la région précoce de ΔBT .

L'étape suivante a été de transfecter les 3T6 et les *scop-T1* avec RmI (contrôle positif), ΣT et ΣT_{bis} . Les résultats obtenus avec les 3T6 sont montrés à la figure 18A. RmI se réplique et recombine comme à l'habitude, ΣT est incapable de se répliquer comme nous l'avons observé précédemment (Fig.5B), et ΣT_{bis} semble se répliquer normalement, sans toutefois recombiner. Le panneau B de la même figure, qui concerne les *scop-T1*, confirme les résultats déjà obtenus avec RmI et ΣT (Fig.5B) et met en évidence l'absence de la SR chez ΣT_{bis} . Puisque ΣT_{bis} se réplique dans les 3T6, il semble que le défaut de ΣT n'en soit pas un de transcription, mais soit plutôt dû à une erreur de synthèse lors de la réaction PCR. Par contre, le fait de conférer à ΣT_{bis} la faculté de réplication autonome ne l'a pas rendu apte à recombiner. Nous avons donc

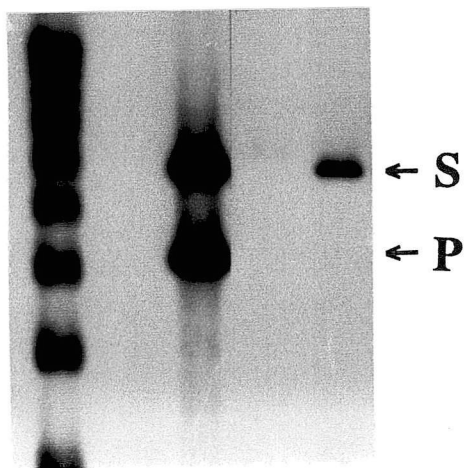
FIGURE 18: Réplication et recombinaison de ΣT et $\Sigma Tbis$

La transfection des cellules 3T6 (A) ou *scop*-T1 (B), ainsi que l'extraction et l'analyse des ADNs se sont déroulées comme précédemment. L'enzyme *Xba*I a été utilisé pour linéariser les substrats (S; 7,1 kb) et produits (P; 5,3 kb) de la recombinaison.

Pistes 1, 2 et 3: *Rm*I, ΣT et $\Sigma Tbis$ respectivement.

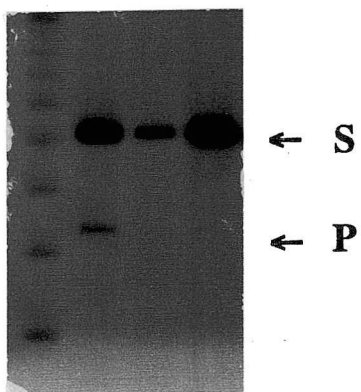
A

L 1 2 3



B

L 1 2 3



décidé de poursuivre l'étude de la recombinaison avec les deux mutants précoces capables de se répliquer, ΔBT et $\Sigma Tbis$, et de ne plus utiliser les autres (ΣT , ΔTC et ΔBTC).

ΔBT et $\Sigma Tbis$, joints aux mutants tardifs PI^+ et PI^- , nous donnaient un ensemble de molécules déficientes ou non dans la SR, mais toutes placées sur un même pied d'égalité en ce qui concerne la répllication autonome, donc (théoriquement) la transcription précoce. A cet égard, l'incapacité de $\Sigma Tbis$ à recombiner remettait en question la relation SR-transcription précoce établie dans la section A (Fig.5B). Le taux de répllication n'étant qu'une mesure très indirecte de l'efficacité de la transcription précoce, nous nous sommes attachés à l'analyse de celle-ci, et plus précisément de la transcription au niveau des répétitions S.

G. Analyse des ARN chez RmI et ses dérivés

Voelkel-Meiman et Keil (1987) ont montré que chez *S. cerevisiae*, la stimulation de la recombinaison par la séquence HOT1 (voir Introduction) implique une transcription des **DEUX** séquences homologues, alors que selon Nickoloff et Reynolds (1990), dans la cellule de mammifère, la transcription d'**UNE SEULE** des deux séquences homologues suffit pour stimuler la recombinaison. Qu'en est-il des répétitions S? La transcription de S1 et S2 est-elle nécessaire à la recombinaison, ou la transcription de l'une des deux suffit-elle? Le passage de la transcription à travers les répétitions S est-il même requis? Pour répondre à la question: "Quel est l'état transcriptionnel des répétitions S1 et S2 chez RmI et ses dérivés", nous avons décidé d'utiliser la méthode RT-PCR (Matériel et Méthodes).

Méthodes).

1) Etude de la transcription précoce chez *RmI* et ses dérivés

Dans des cellules de souris infectées par Py, Acheson et Miéville (1978) ont montré que 15% des ARN précoces nucléaires et 5% des ARN précoces cytoplasmiques comportent des séquences situées en aval du site de polyadénylation (nt 2930; Lanoix *et al.*, 1986). Cela veut dire que même si S1 est située en dehors de l'unité de transcription précoce, sa transcription n'est pas chose impossible. De plus, puisque les derniers travaux concernant la régulation de la transcription précoce semblent indiquer qu'il n'y a pas répression de cette transcription en phase tardive (Bergqvist *et al.*, 1990; Hyde-DeRuyscher et Carmichael, 1988; Munholland *et al.*, 1992), nous pouvons penser que l'état transcriptionnel de S1 se maintient tout au long du cycle infectieux.

Les cellules *scop*-T1 ont donc été transfectées avec *RmI*, Σ Tbis, Δ BT, A3⁺ et A3⁻. Deux jours après incubation à 33°C, l'ARN total a été isolé comme décrit dans la section Matériel et Méthodes. En utilisant des amorces bordant S1, il est possible, grâce au RT-PCR, de détecter de façon **QUALITATIVE** si le complexe transcriptionnel traverse cette répétition chez *RmI* et ses mutants. De façon plus détaillée, l'amorce PB11 (nt -1418 à -1440) a été utilisée pour effectuer la transcription inverse des ARN puis, en combinaison avec l'amorce DJ3 (nt 3001 à 3020), pour effectuer la réaction de PCR (Fig.19A). Donc, dans un échantillon donné, s'il y a transcription de S1, un fragment de 482 pb (JP) sera synthétisé, et ce fragment pourra être détecté sur autoradiogramme après électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%, transfert sur nylon et

FIGURE 19: RT-PCR/CI et RT-PCR/JP sur RmI et ses dérivés***A. Localisation des amorces utilisées***

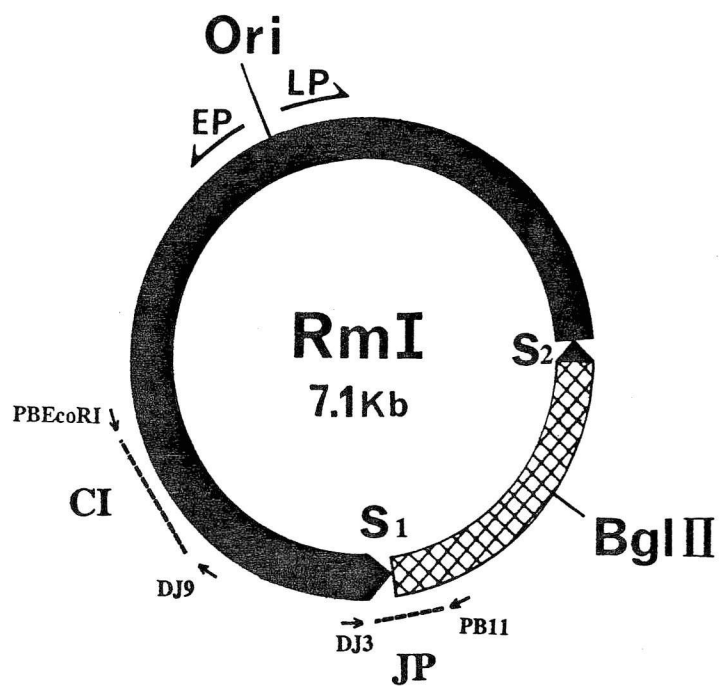
On retrouve ici RmI (ou un de ses mutants) avec la symbolique utilisée à la figure 2. L'amplification du fragment JP débute par une réaction de transcription reverse utilisant l'amorce PB11 (nt -1418 à -1440). Le PCR (programme "touchdown", Matériel et Méthodes) est effectuée avec la paire d'amorces DJ3 (nt 3001 à 3020) et PB11. Le fragment amplifié fait 482 pb.

L'amplification du fragment interne à la séquence codante précoce (fragment CI) débute encore par une réaction de transcription reverse utilisant cette fois l'amorce DJ9 (nt 2317 à 2298). La réaction PCR est effectuée avec la paire d'amorces PBEcoRI (nt 1556 à 1572) et DJ9. Le fragment amplifié a une taille de 761 pb.

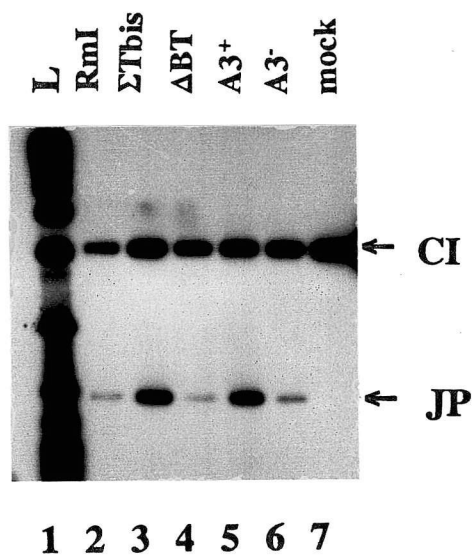
B. RT-PCR sur RmI et ses dérivés

Les cellules *scop*-T1 ont été transfectées avec 2 μ g par Pétri de chacun des ADN indiqués, ou transfectées en l'absence d'ADN (mock). Deux jours après incubation à 33°C, l'ARN total a été extrait des cellules et analysé par RT-PCR (Matériel et Méthodes), avec les amorces citées en A. CI: controle interne; JP: jonction précoce.

A



B



ni même aucun fragment hybridable avec une sonde RmI. En effet, on ne s'attend pas à ce que l'amorce PB11, spécifique de Ins, réagisse avec l'ARN provenant du génome viral intégré dans les cellules *scop*-T1. D'un autre côté, sans qu'il y ait absence de transcription au travers de S1, il peut y avoir une baisse du taux de celle-ci. Même si le taux d'initiation est le même pour les mutants et pour RmI, l'élongation peut quant à elle être affectée par les mutations apportées au niveau de la région intergénique (Kash et Kellems, 1994). Afin de vérifier cette dernière hypothèse, nous avons décidé de comparer, d'une molécule à l'autre, l'intensité d'un fragment RT-PCR interne, c'est-à-dire faisant partie de l'unité de transcription précoce, à l'intensité du fragment JP. Les amorces utilisées pour effectuer le contrôle interne (CI) sont PB*Eco*RI (nt 1556 à 1572) et DJ9 (nt 2317 à 2298). La taille du fragment attendu est de 761 pb (Fig.19A). Donc, pour tous les échantillons analysés (RmI, Σ Tbis, Δ BT, A3⁺ et A3⁻), un fragment de 761 pb devrait être amplifié et détecté, y compris dans les cellules transfectées à blanc, puisque les *scop*-T1 sont transformées avec un génome Py ayant une transcription précoce active (Rautman *et al.*, 1982). Nous nous attendons donc à retrouver, chez le mock, une bande de 761 pb dont l'intensité représente le taux basal d'expression de la région précoce, et une bande d'intensité supérieure chez tous les autres échantillons qui possèdent, en plus d'un génome intégré, des réplicons ayant eux aussi une transcription précoce active. A partir d'une même préparation d'ARN pour chaque molécule, un RT-PCR/CI et un RT-PCR/JP ont été effectués dans des tubes séparés. Une fraction (1/10) de chaque amplification a été déposée sur un même gel, dans la même piste, mais à deux temps différents, pour favoriser la bonne séparation des fragments PCR, le fragment de

plus petite taille (JP) ayant été déposé le premier.

La figure 19B montre les résultats obtenus. Pour chacune des molécules transfectées, le fragment de 482 pb est présent. L'absence de ce fragment dans la piste 6 (mock) prouve qu'il n'y a pas eu contamination d'un des réactifs par de l'ADN de RmI. Les mutants Σ Tbis et A3⁻, lourdement affectés au point de vue recombinaison (Fig.18B et Fig.6B), et le mutant Δ BT, également affecté dans sa recombinaison mais moins que les deux précédents (Fig.5B), ont tous une S1 traversée par le complexe transcriptionnel. Le défaut de recombinaison chez ces trois mutants ne peut donc pas être associé à une absence de transcription au travers de S1, ce à quoi l'on pouvait s'attendre de la part de A3⁻, qui est un mutant tardif. Toutefois, en examinant la bande CI, nous constatons que tout n'est pas comme nous l'avions imaginé au départ. En effet, la bande ayant l'intensité la plus forte est celle du mock. Ce résultat, sans nous renseigner sur l'élongation de la transcription précoce, nous est utile dans le sens où il montre clairement que, d'un échantillon à l'autre, nous ne pouvons absolument pas comparer l'intensité des bandes puisqu'un contrôle interne lui-même semble soumis à une variation. Ceci est sans doute dû au fait que la quantité d'ARN extraite varie d'un échantillon à l'autre. De plus, puisque la quantité de cellules ayant capté l'ADN lors de la transfection peut elle aussi varier d'un Pétri à l'autre, nous ne pouvons pas, non plus, comparer dans une même piste l'intensité du fragment CI (qui augmente avec la quantité de cellules récoltées) à l'intensité du fragment JP (qui augmente avec la quantité de cellules ayant capté l'ADN exogène). La solution à ce problème était de mesurer le rapport CI/JP pour des cellules permissives non-transformées par Py, comme les 3T6. Toutefois, pour des

raisons techniques, cette expérience n'a pas été effectuée.

Quoiqu'il en soit, les mutants Σ Tbis, Δ BT et A3⁻ ont, semble-t-il, une transcription précoce se rendant jusqu'à S1. Mais qu'en est-il de leur transcription tardive? A-t-elle lieu? Si oui, se rend-t-elle jusqu'à S2?

2) Etude de la transcription tardive chez RmI et ses dérivés

La répétition S2 fait partie de la séquence codant pour la protéine tardive VP1. Comme l'ont montré Hyde-DeRuyscher et Carmichael (1988) et Munholland *et al.* (1992), la transcription tardive chez Py a lieu en phase précoce ET en phase tardive d'infection. Ainsi, tout mutant ayant un promoteur tardif fonctionnel devrait montrer une transcription de la région S2. L'expérience projetée allait donc nous permettre de vérifier si les modifications apportées dans la région intergénique chez Σ Tbis et Δ BT avaient une influence sur l'activité promotrice tardive et, par conséquent, sur la transcription de S2. Le mutant A3⁻ devait nous servir de contrôle négatif puisque le promoteur de base, défini par Bourachot *et al.* (1989) comme allant des nt 5130 à 5022, est ici inversé.

Pour détecter l'état transcriptionnel de S2 chez RmI et ses mutants, nous avons utilisé la paire d'amorces bordant S2, PB10 (-264 à -245) et DJ8 (3291 à 3270). La transcription inverse a été faite avec l'amorce PB10. Un fragment de 442 pb (JT) est attendu (Fig.20A), sauf encore une fois chez les *scop*-T1 mock-transfectées. La figure 20B montre que toutes les molécules analysées, A3⁻ compris, ont une S2 transcrite. Aucun fragment n'est détecté chez le mock, ce qui confirme l'absence de contamination par de l'ADN de RmI. La présence du fragment JT chez tous les échantillons montre

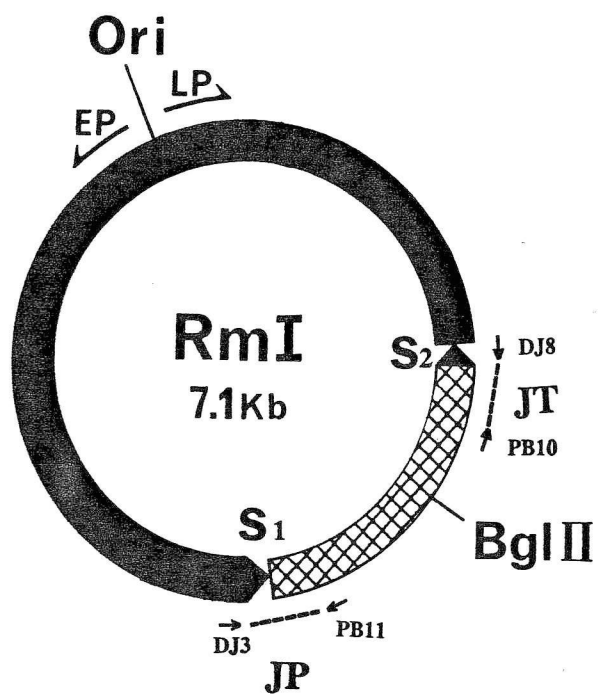
FIGURE 20: RT-PCR/JP et RT-PCR/JT sur RmI et ses dérivés***A. Localisation des amorces utilisées***

On retrouve ici RmI (ou un de ses mutants) avec la symbolique utilisée à la figure 2. L'amplification du fragment JP est réalisée comme décrit dans la légende de la figure 19. L'amplification du fragment JT débute par une réaction de RT utilisant l'amorce PB10 (-264 à -245). La réaction PCR est effectuée avec la paire d'amorces DJ8 (3291 à 3270) et PB10. Le fragment amplifié fait 442 pb.

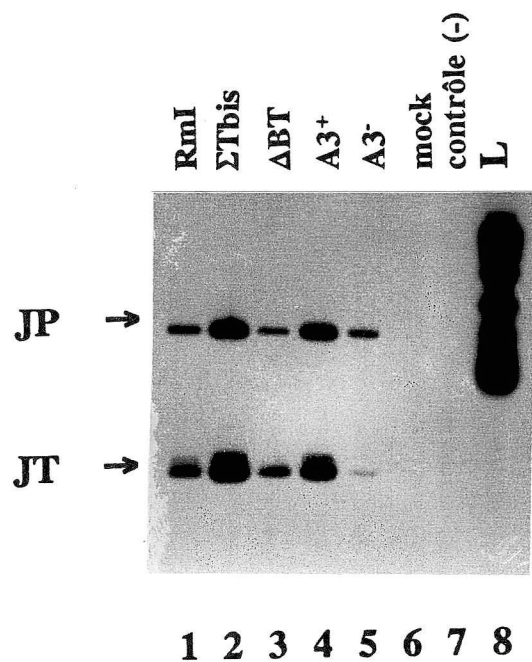
B. RT-PCR sur RmI et ses dérivés

Les cellules *scop*-T1 ont été transfectées avec 2 μ g par Pétri de chacun des ADN*s* indiqués, ou transfectées en l'absence d'ADN (mock). Deux jours après incubation à 33°C, l'ARN total a été extrait des cellules et analysé par RT-PCR avec les amorces citées en A. JP: jonction précoce; JT: jonction tardive. Contrôle négatif: mélange réactionnel sans ARN.

A



B



deux choses: la première, les modifications apportées dans la région régulatrice précoce ne semblent pas affecter de façon significative l'activité promotrice tardive; la seconde, l'inversion du fragment 5026-5271 n'est pas suffisante pour inactiver complètement la transcription tardive de Py.

La figure 20B montre la présence d'un deuxième fragment dans les pistes 1 à 5, le fragment JP. Nous avons en fait répété l'expérience précédente (Fig.19B), mais cette fois-ci avec un RT-PCR/JP et un RT-PCR/JT. Nous pouvons ainsi mesurer d'une part la quantité de messages franchissant S1, et d'autre part la quantité de messages passant au travers de S2. Il s'agit bien là d'analyse **QUANTITATIVE**, puisque les deux variables (JP et JT) font intervenir un seul et même substrat pour chaque molécule transfectée. L'intensité des bandes a été quantifiée à l'aide d'un densitomètre Corning (système 750) et le rapport JT/JP a été calculé pour chaque échantillon. Le tableau I est une compilation des résultats de 3 expériences similaires. En examinant la moyenne, nous constatons qu'il n'y a aucune différence significative entre RmI et les mutants précoces. Le seul mutant se comportant différemment est A3'. L'analyse de ces résultats sera approfondie dans la section Discussion, mais l'on peut déjà dire que le RT-PCR n'a pas permis de mettre en évidence des différences flagrantes entre RmI et les mutants précoces, qu'il s'agisse de ΔBT (plus ou moins handicapé dans la recombinaison) ou de $\Sigma Tbis$ (très handicapé).

3) Analyse des ADN 3 jours après transfection

Tous les essais de réplication-recombinaison ont été faits avec des échantillons

Rapports JT/JP pour RmI et ses dérivés.

	A	B	C	Moyenne ^(a)
RmI	2,4	4,2	3,4	3,33
ΣTbis	1,9	2,7	4,9	3,17
ΔBT	1,6	5,4	3,5	3,50
A3⁺	-	2,5	3,5	3,00
A3⁻	-	0,6	0,2	0,40

A Expérience # 1, ARNs extraits à deux jours.

B Expérience # 2, ARNs extraits à deux jours.

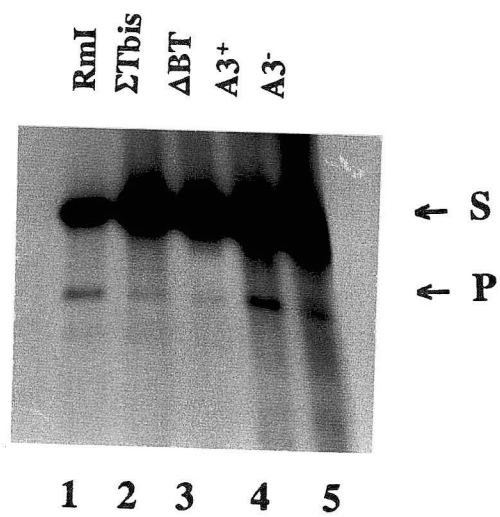
C Expérience # 3, ARNs extraits à trois jours.

(a) L'analyse de variance classique (ANOVA) est inappropriée à ces données. Le test de Welch montre qu'il existe une différence significative entre les cinq moyennes ($p = 0,03$).

récoltés 5 ou 6 jours après transfection (sections précédentes). Les essais RT-PCR sont pour leur part effectués sur des ARN extraits des cellules 2 ou 3 jours après transfection. Il nous a donc semblé intéressant d'analyser des ADN extraits 72 heures post-infection, pour avoir une idée plus juste du comportement des mutants par rapport à RmI à ce moment-là. La figure 21 montre qu'après 3 jours d'incubation à 33°C, RmI et A3⁺ recombinaient plus efficacement que Σ Tbis, Δ BT et A3⁻. Ce résultat indique que les temps de récolte choisis pour le RT-PCR sont les bons puisqu'ils correspondent à un moment où les différences de recombinaison entre les molécules utilisées se font déjà sentir.

FIGURE 21: Essai de réplication-recombinaison pour 3 jours de transfection

Les cellules *scop*-T1 ont été transfectées avec les molécules indiquées. Après trois jours d'incubation à 33°C, l'ADN de faible P.M. a été extrait des cellules et analysé comme décrit dans la figure 5B. S: substrat; P: produit.



DISCUSSION

A. Analyse de la SR chez RmI et ses mutants

Au début de la présente étude, nous avons utilisé un système pouvant nous indiquer, indirectement toutefois, si la transcription influence la recombinaison chez RmI. L'essai était basé sur la présomption qu'une molécule dont l'unité de transcription virale précoce est placée sous le contrôle d'un promoteur muté ne pourra pas produire de protéines précoces, ne pourra pas se répliquer dans les 3T6 et ne sera donc pas détectée sur autoradiogramme. Si cette même molécule est introduite dans des *scop*-T1, la protéine LT fournie en *trans* par la cellule pourra assurer la répllication de la molécule, mais si la recombinaison est dépendante de la transcription, la molécule se répliquera sans recombinaison.

La transfection des 3T6 avec RmI, Δ Pe, Δ BT, Δ TC, Δ BTC et Σ T a montré que RmI et Δ BT sont les seuls à se répliquer (et à recombinaison) dans les 3T6. En se référant à l'hypothèse de départ, le mutant Δ BT est le seul à disposer d'une unité de transcription précoce qui soit fonctionnelle, et si la transcription précoce exerce une influence quelconque sur la recombinaison, seuls RmI et Δ BT devraient recombinaison dans les *scop*-T1. Tel est le cas, mais Δ BT recombine toutefois toujours un peu moins bien que RmI, quel que soit le type cellulaire utilisé (3T6: RmI, 100% et Δ BT, 18,2%; *scop*-T1: RmI, 100% et Δ BT, 8,3%; Fig.5B). Comme prévu, dans les *scop*-T1, les mutants Δ Pe, Δ TC, Δ BTC et Σ T se répliquent (quoique légèrement moins bien que RmI et Δ BT, résultat pouvant s'expliquer par le fait que ces deux molécules codent pour un LT qui vient

s'ajouter à celui des *scop*-T1), et recombinent très faiblement, les pourcentages de conversion étant de 1,1%, 1,0%, 2,4% et 1,1% respectivement (Fig.5B). Ces faibles taux de conversion pourraient représenter l'efficacité de recombinaison entre deux séquences partageant 182 pb d'homologie, en l'absence de toute stimulation, par exemple.

Le fait que des molécules capables de coder pour LT (RmI et Δ BT) se répliquent mieux, dans les *scop*-T1, que ceux incapables d'en faire autant (Δ Pe, Δ TC, Δ BTC et Σ T) nous a amenés à nous demander si, en présence d'une plus grande quantité de LT, nous n'allions pas stimuler la recombinaison chez ces derniers. Toutefois, les résultats obtenus avec des mutants tardifs tendent à réfuter cette hypothèse. En effet, les mutants tardifs P155⁻ et A3⁻ se répliquent tout aussi bien que RmI (dans les 3T6 et les *scop*-T1) et, malgré cela, ils recombinent à peine (1,9% pour chaque mutant, Fig.6B; taux comparable à ce qui a été observé avec Δ Pe, Δ TC, Δ BTC et Σ T). Les expériences de co-transfection des 3T6 avec chaque mutant et pPB21 ont effectivement montré que la présence d'une quantité supplémentaire de LT ne stimule pas la recombinaison des molécules handicapées. Nous n'avons pas mesuré directement la quantité de LT dans les 3T6 co-transfectées et dans les *scop*-T1, mais puisque pPB21 est un réplicon actif (Fig.8 et 9), nous avons de bonnes raisons de croire que dans une cellule 3T6 transfectée avec pPB21, il y a plus de LT que dans une cellule *scop*-T1, où une seule copie d'ADN Py intégré assure la synthèse des protéines précoces.

La transfection des *scop*-T1 et la co-transfection des 3T6 sont deux expériences montrant clairement que la présence de LT n'est pas suffisante pour assurer la

recombinaison d'un substrat donné. Par ailleurs, la co-transfection des 3T6 a permis de mettre en évidence un phénomène encore jamais observé dans le laboratoire, sujet qui sera abordé à la section C de la Discussion.

L'essai utilisé pour établir une corrélation entre recombinaison et transcription, c'est-à-dire l'essai de réplication-recombinaison, est très indirect. On peut facilement imaginer qu'une molécule ait une région précoce normalement transcrite, mais qu'un problème de traduction du message, ou encore la traduction d'un message comportant une ou plusieurs mutations, empêche la synthèse de la protéine ou donne naissance à une protéine non fonctionnelle. Dans ce cas, les mutants précoces ΔPe , ΔTC , ΔBTC et ΣT ne seraient pas affectés dans leur transcription, et leur difficulté à recombiner serait imputable à d'autres facteurs. Nous avons éclairci ce point pour le mutant ΣT . En remplaçant la région codante précoce de ΣT par la région correspondante de ΔBT , nous avons rétabli chez $\Sigma Tbis$ la synthèse de LT et confirmé que le défaut propre à ΣT n'était pas - ou n'était pas seulement - un défaut d'initiation de la transcription, mais qu'il était sans doute attribuable avant tout à la synthèse d'une protéine LT non fonctionnelle dans la réplication. Nous supposons qu'il y a eu erreur de synthèse au niveau de la séquence codant pour LT lors de la réaction PCR effectuée pour construire ΣT (Construction des ADN plasmidiques). Même si $\Sigma Tbis$ réplique dans les 3T6, il s'y recombine faiblement et ne recombine pas plus que ΣT dans les *scop*-T1 (Fig.18, A et B). $\Sigma Tbis$ est donc un mutant de RmI fortement handicapé dans sa recombinaison malgré une transcription précoce suffisante pour lui assurer une réplication autonome. L'analyse de la transcription par RT-PCR, chez plusieurs des molécules utilisées, a été entreprise, entre

autres, pour résoudre ce problème.

En ce qui concerne les mutants tardifs, où la question de la transcription précoce ne se pose pas (ces mutants se répliquent aussi bien que RmI dans les 3T6), le fait que l'inversion du promoteur tardif (mutation Pl⁻) annule pratiquement le taux de conversion (mutants A3⁻ et P155⁻, Fig.6B) semble clairement établir un lien entre transcription tardive et recombinaison. Il faut souligner cependant que l'expression des gènes tardifs conduit à la synthèse des protéines de structure de Py, notamment VP1 qui est la composante majeure de la capside virale (Tooze, 1980). Dans nos expériences, l'ADN est récolté après six jours de transfection à 33°C, ce qui correspond à 96 h à 37°C, la durée de deux cycles viraux (Tooze, 1980). L'ADN Py produit par recombinaison entre les répétitions S a donc théoriquement le temps de s'encapsider et les virions formés d'amplifier le signal initial par un deuxième cycle d'infection et de réplication. Un mutant tardif serait évidemment handicapé dans ce deuxième cycle et semblerait par le fait même affecté dans la SR. Des expériences récentes (D. Gendron, communication personnelle) indiquent que ce phénomène n'est pas à négliger, mais des échantillons analysés après trois jours de transfection (donc l'équivalent d'un cycle viral) ont démontré que des différences dans le taux de recombinaison entre RmI et ses différents mutants étaient déjà présentes (Fig.21), ce qui tend à prouver que les mutations introduites affectent réellement la capacité des molécules à recombiner. Par ailleurs, l'hypothèse du deuxième cycle d'infection ne devrait pas jouer pour les mutants précoces de RmI, pour lesquels il semble que l'enclenchement de la transcription tardive se fasse normalement (section suivante).

B. Transcription des répétitions S chez RmI et ses mutants.

Le RT-PCR semblait la technique appropriée pour analyser la transcription des répétitions S et pour déterminer si, oui ou non, leur transcription est nécessaire à la recombinaison. En effet, une analyse simplement **qualitative** permettait de répondre aux questions que nous nous posions: 1) la répétition S1 est-elle transcrite chez RmI? 2) si la réponse à la question #1 est oui, les mutations précoces affectent-elles la transcription de S1? 3) les mutations précoces affectent-elles la transcription de la répétition S2? 4) la mutation tardive affecte-elle la transcription de S2? 5) la mutation tardive affecte-elle la transcription de S1?. Le RT-PCR ne permet toutefois pas de répondre à une question comme: la transcription de la S1 chez telle molécule est-elle plus efficace que chez telle autre? Nous ne pouvons pas comparer l'intensité des bandes d'un mutant à l'autre à cause des variations de quantité d'ARN entre les différents échantillons (voir Résultats). Il est toutefois possible de comparer des rapports entre messages tardifs et précoces (JT/JP, Fig.20B) obtenus pour différentes molécules. Cependant, deux rapports identiques ne veulent pas nécessairement dire que les deux réplicons ont des transcriptions précoce et tardive comparables. Ainsi, un mutant ayant un taux de transcription précoce et tardive très faible aura un rapport JT/JP égal à celui d'un réplicon ayant une transcription précoce très active et une transcription tardive également très efficace.

Le RT-PCR a apporté une réponse claire aux questions posées. La répétition S1 est transcrite chez RmI, résultat conforme à ceux d'Acheson et Miéville (1978), où les auteurs montrent que 15% des ARN précoces nucléaires et 5% des ARN précoces cytoplasmiques comportent des séquences situées en aval du site de polyadénylation (nt

2942). Les mutants précoces (Σ Tbis et Δ BT) ont aussi une répétition S1 traversée par le complexe transcriptionnel (Fig.19B). Ce n'est donc pas là que réside leur faible capacité à recombiner. Les mutations précoces ne semblent pas avoir d'effet majeur sur l'activité transcriptionnelle de l'unité tardive virale (Fig.20B), et Σ Tbis et Δ BT devraient donc être à égalité avec RmI dans le cas d'un deuxième cycle d'infection. La mutation tardive (mutant A3⁻) abaisse le rapport JT/JP (Fig.20B), et exerce donc soit un effet positif sur l'activité du promoteur précoce, soit un effet négatif sur l'activité promotrice tardive. Même si nous ne pouvons le prouver par la technique du RT-PCR, au vu de la faiblesse de la bande JT chez A3⁻, nous croyons que l'inversion de la région 5028-5268 (mutation Pl⁻) nuit en effet fortement à la transcription des séquences tardives, notamment S2. La mutation doit nuire aussi, forcément, à la course de la transcription tardive tout autour du génome (Acheson, 1978; Hyde-DeRuyscher et Carmichael, 1988) et donc à son passage dans la répétition S1 (dans le sens anti-précoce).

En conclusion, le RT-PCR nous a permis de répondre aux questions posées, mais n'a pas permis de mettre en évidence une différence entre les molécules capables de recombiner et les molécules handicapées puisque, parmi ces dernières, deux ne sont pas affectées (Σ Tbis et Δ BT), et l'une est affectée (A3⁻), au niveau de la transcription. Le RT-PCR n'est pas une technique permettant de relever des différences, d'une molécule à l'autre, dans le taux d'initiation de la transcription ou encore dans la composition du complexe transcriptionnel. Par exemple, il a été montré que l'introduction de mutations dans la région entourant le site d'initiation de la transcription, peut modifier le déplacement du complexe transcriptionnel (reconnaissance ou non des sites de pause),

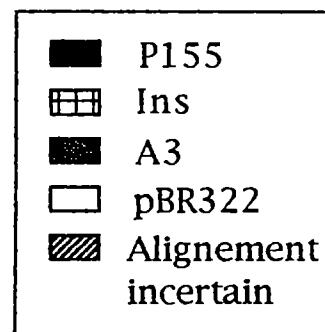
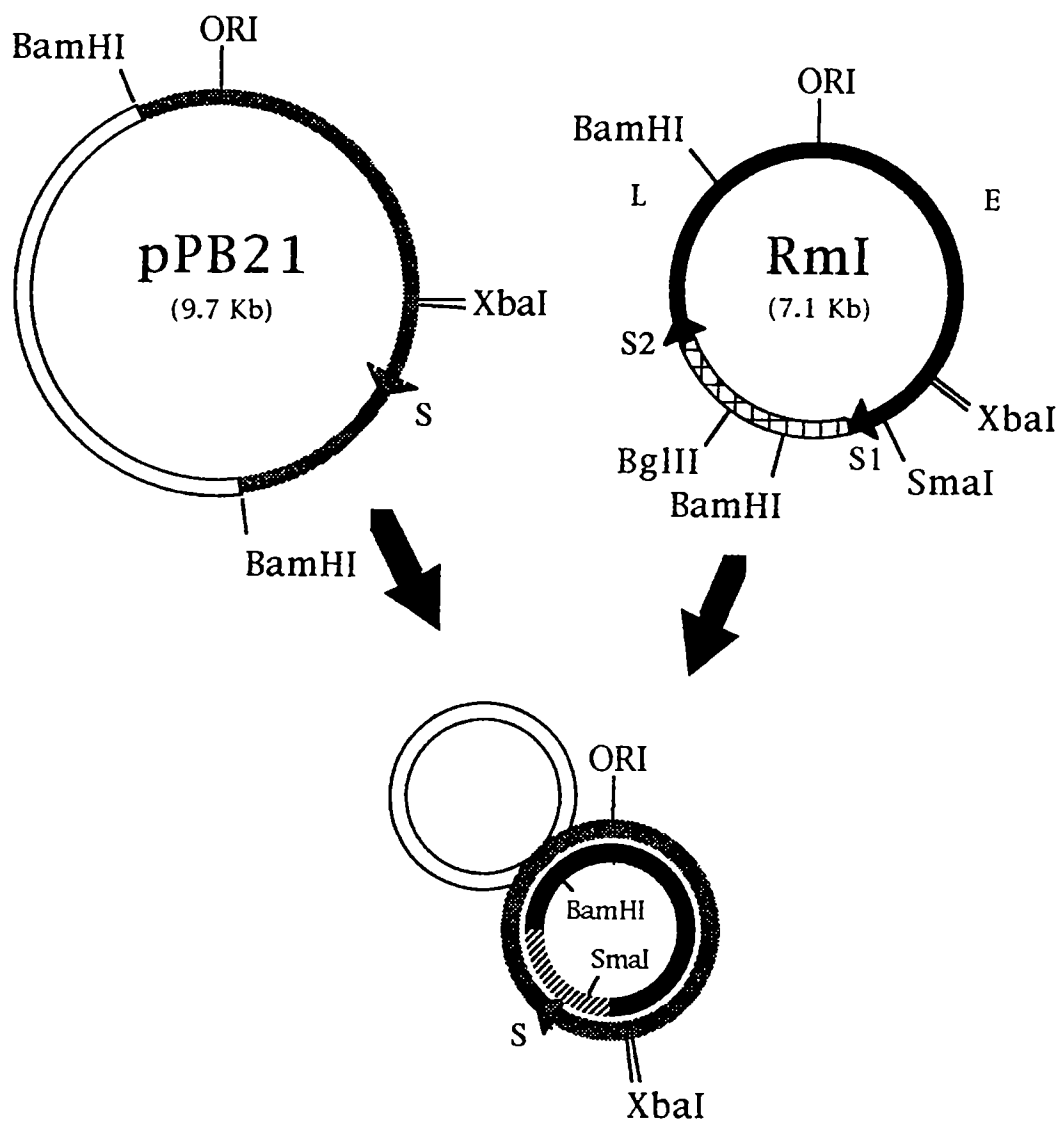
sans affecter le taux d'initiation (Kash et Kellems, 1994). Si les mutations introduites dans la région régulatrice de RmI entraînent des changements mineurs (modulation fine) dans la régulation de la transcription, des méthodes plus sophistiquées d'analyse de l'expression des gènes sont sans doute nécessaires.

C. Co-transfection des 3T6: production efficace d'ADN viral de longueur unitaire

Les expériences de co-transfection ont permis de mettre en évidence un phénomène assez intéressant: la production de génomes viraux à partir de pPB21 (A3 cloné dans pBR322). Il s'agit d'un événement nécessitant deux molécules différentes, la région interrompue chez l'une par les séquences plasmidiques devant être continue chez l'autre (Résultats, section D). Les expériences effectuées ne permettent toutefois pas de dire si la production d'ADN viral de longueur unitaire, comportant des séquences A3, est due à un événement de conversion génique (utilisant comme matrice la molécule co-transfectée, RmI ou un de ses dérivés) ou si elle est due à un événement de double "crossing-over" (transfert d'un fragment de RmI ou autre à pPB21). Dans le premier cas, il faut supposer une cassure et une dégradation des séquences pBR322, suivies du processus de conversion génique proprement dit (Szostak *et al.*, 1983). Dans le deuxième cas, le fragment de RmI remplacerait simplement le fragment homologue de A3 lié au pBR322. Dans les deux cas, le résultat serait le même, c'est-à-dire l'élimination des séquences plasmidiques et la formation d'un ADN hybride A3/P155 de 5,3 kb. La figure 22 est une tentative de représentation du phénomène que nous avons observé.

FIGURE 22: Recombinaison intermoléculaire entre pPB21 et RmI ou un de ses dérivés

L'exemple donné dans la figure montre comment RmI - ou d'ailleurs P155 - peut servir de matrice pour amener l'excision des séquences plasmidiques (pBR322) chez pPB21. Puisque nous ne pouvons dire si c'est RmI ou son produit P155 qui sert de matrice, la région comprenant l'Ins et les répétitions S1 et S2 n'est pas définie (zone hachurée) dans l'image du bas.



D. La SR et la LR chez les molécules à deux régions intergéniques

1) La SR

La SR ne semble pas dépendante de l'orientation de la seconde région intergénique introduite dans Ins. Des résultats similaires ont été obtenus avec les fragments 5022-1192 et 4633-1192 insérés dans les deux orientations. Donc, pour simplifier la nomenclature, nous parlerons de O(5022)/RmI et O(4633)/RmI.

Comment expliquer que la SR donne toujours le produit T et parfois le produit B chez O(5022)/RmI, alors qu'elle donne toujours les deux produits chez O(4633)/RmI? Une explication possible est que le fragment 4633-5022 (ou fragment BamHI-BclI), absent chez O(5022)/RmI, exerce une fonction accessoire dans la recombinaison SR. Par exemple, pour un environnement cellulaire donné, la production de B pourrait exiger la présence du fragment 4633-5022 alors que, dans d'autres conditions, celle-ci pourrait être facultative. Notons que, chez O(5022)/RmI, si la séquence 4633-5022 ne fait pas partie de la région intergénique introduite dans Ins, elle fait toutefois partie de la région intergénique de P155 bordant O1 du côté tardif (Fig.13). Donc, pour qu'il y ait production de B, il ne faudrait pas seulement que l'environnement cellulaire soit favorable et que le fragment en question soit présent sur le réplicon, mais encore faudrait-il qu'il soit bien positionné (près de O1) ou présent en double exemplaire. Des travaux sont présentement en cours pour étudier l'implication du fragment BamHI-BclI dans la recombinaison chez RmI.

La SR est-elle conservative ou non? Précisons d'abord qu'un événement conservatif génère simultanément les deux produits réciproques. Un mécanisme non

conservatif peut comporter quant à lui deux types d'événements. Un premier type, aléatoire, où l'événement de recombinaison donne indifféremment l'un ou l'autre des produits attendus, le réciproque de chacun étant dégradé (Chakrabarti et Seidman, 1986). Un second type, biaisé volontairement, où tous les événements donnent le même produit, l'autre étant toujours dégradé (Lin *et al.*, 1990). Puisque notre système d'étude repose sur l'analyse des événements de recombinaison ayant lieu dans l'ensemble des cellules d'un même Pétri, le seul type d'événement pouvant ici être identifié est l'événement non conservatif biaisé. Donc, puisque la SR génère les deux produits, T et B, nous ne pouvons pas dire si elle est conservative ou non conservative. La construction d'autres dérivés de RmI sera sans doute nécessaire pour éclaircir ce point.

2) La LR

Chez O(4633,+)/RmI, la LR donne de façon constante et en quantités comparables les deux produits réciproques, soit L et R. L'expérience avec le mutant $\Delta O2$ (Fig.15B) a montré que les produits L et R ne sont pas associés à une origine en particulier: O1 et O2 se retrouvent indifféremment liées à l'un ou l'autre produit. Ce qui signifie qu'il n'y a pas un site privilégié de "crossing-over", mais que ce dernier peut avoir lieu sur toute la longueur de l'homologie. De plus, ce résultat confirme le caractère non sélectif, aléatoire, de la LR, et nous empêche encore de dire si elle est conservative ou non. C'est le double mutant DM (mutation ΣT près de O1, Pl^- près de O2) qui a permis d'établir que la LR est un mécanisme non conservatif puisque ce dérivé de O(4633,+)/RmI ne donne que le produit R (Fig.17B), la disparition du produit L n'étant

d'ailleurs pas clairement comprise. D'autres mutants de O(4633,+)/RmI, portant des mutations précoces ou tardives dans l'une ou l'autre des régions intergéniques, ou dans les deux, ont été construits depuis (A. Fricker, mémoire de maîtrise). Le résultat obtenu avec DM a été reproduit avec plusieurs mutants, simples ou doubles, ayant en commun la présence de la mutation Pl⁻ (inversion de la séquence 5028-5268) près de l'origine O2 (S. Veilleux, communication personnelle).

Donc, tout comme la région BamHI-BclI (4633-5022) semble avoir de l'importance au niveau de la production de B, via la SR (voir le paragraphe précédent, traitant de la SR), la région 5028-5268 semble exercer un effet sur la LR. Rappelons qu'un élément stimulateur de la transcription tardive a été identifié dans la première région, et que le promoteur basal tardif est contenu dans la deuxième (Bourachot *et al.*, 1989). Soulignons également que la mutation Pl⁻ a pour conséquence, non seulement d'inverser le promoteur tardif, mais aussi de rompre la continuité entre les deux régions (4633-5021 et 5028-5268), et l'on ne sait pas pour le moment si les deux séquences agissent indépendamment ou de façon concertée dans la recombinaison. Dans les deux cas cependant, nous parlons d'une région régulatrice tardive bordant O2. Un résultat obtenu par Angèle Fricker (mémoire de maîtrise) avec un mutant de O(4633,+)/RmI représentant l'image miroir de DM (Pl⁻ près de O1 et Σ T près de O2) montre que cette molécule donne les deux produits de la LR. Ceci indique clairement qu'une mutation donnée peut exercer un effet sur la recombinaison, mais que cet effet n'est pas seulement dû à la mutation même, qu'il dépend aussi de l'environnement de cette dernière. Là encore, des expériences sont en cours pour élucider le rôle de la région tardive située

près de O2 dans la recombinaison LR.

E. Conclusion

Les résultats obtenus avec RmI et ses dérivés dans des cellules de mammifères ont montré: 1) une dépendance de la recombinaison face à certains éléments régulateurs de la transcription, comme la boîte TATA précoce, le site B de fixation à LT, le promoteur tardif (nt 5028-5268) et la séquence stimulatrice de la transcription tardive (nt 4633-5022); 2) l'absence probable d'un lien direct entre recombinaison et passage du complexe transcriptionnel au travers des répétitions S; 3) l'existence d'événements de recombinaison intermoléculaire donnant naissance à des produits viraux de longueur unitaire à partir de deux molécules interrompues à des sites différents par des séquences plasmidiques.

REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement les Docteurs Pierre et Danielle Bourgaux de m'avoir acceptée dans leur laboratoire et d'avoir bien voulu diriger ce travail de recherche.

Je remercie également Louis Delbecchi pour tout le temps qu'il m'a consacré, c'est-à-dire autant pour ses explications que pour ses conseils, ses encouragements et sa compréhension.

Je remercie Robert Black pour l'analyse statistique des données du Tableau I.

Je remercie tous les copains qui ont su agrémenter mes six dernières années, Daniel, Dominique, Stéphane, Attila et Louis-Charles.

Mes remerciements s'adressent enfin à mes parents, qui m'ont toujours encouragée d'une façon très saine.

Ce travail a été subventionné par le Conseil de recherches médicales du Canada.

BIBLIOGRAPHIE

Acheson, N. (1978). Polyomavirus giant RNAs contain tandem repeats of the nucleotide sequence of the entire viral genome. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, 75: 4754-4758.

Acheson, N.H. et F. Miéville (1978). Extent of transcription of the E strand of polyoma virus DNA during the early phase of productive infection. *J. Virol.*, 28: 885-894.

Adami, G.R. et G.G. Carmichael (1987). The length but not the sequence of the polyoma virus late leader exon is important for both late RNA splicing and late gene expression. *Nucleic Acids Res.*, 15: 2593-2610.

Alt, F.W., Blackwell, T.K. et G.D. Yancopoulos (1987). Development of the primary antibody of the primary repertoire. *Science*, 238: 1079.

Basilico, C., Gattoni, S., Zouzias, D. et G. DellaValle (1979). Loss of integrated viral DNA sequences in polyoma-transformed cells is associated with an active viral a function. *Cell*, 17: 645-659.

Bendig, M.M., Thomas, T. et W.R. Folk (1980). Regulatory mutants of polyomavirus defective in DNA replication and the synthesis of early proteins. *Cell*, 20: 401-409.

Bergqvist, A., Nilsson, M., Bondeson, K. et G. Magnusson (1990). Loss of DNA-binding and new *trans*-activation function in polyomavirus large T-antigen with mutation of zinc finger motif. *Nucleic Acids Res.*, 18: 2715-2720.

Botchan, M., Stringer, J., Mitchison, T. et J. Sambrook (1980). Integration and excision of SV40 DNA from the chromosome of a transformed cell. *Cell*, 20: 143-152.

Bourachot, B., Yaniv, M. et P. Herbolme (1989). Control elements situated downstream of the major transcriptional start site are sufficient for highly efficient polyomavirus late transcription. *J. Virol.*, 63: 2567-2577.

Bourgaux, P., Delbecchi, L., Yu, K.K.Y. et D. Bourgaux-Ramoisy (1978). A mouse embryo cell line carrying an inducible, temperature-sensitive, polyoma virus genome. *Virology*, 88: 348-360.

Bourgaux, P., Sylla, B.S. et P. Chartrand (1982). Excision of polyoma virus DNA from that of a transformed mouse cell: identification of a hybrid molecule with direct and inverted repeat sequences at the viral-cellular joints. *Virology*, 122: 84-97.

Bourgaux, P., Gendron, D. et D. Bourgaux-Ramoisy (1990). Preferred crossover sites on polyomavirus DNA. *J. Virol.*, 64: 2327-2336.

Capone, M., Watrin, F., Fernex, C., Horvat, B., Krippel, B., Wu, L., Scollay, R. et P. Ferrier (1993). TCRb and TCRA gene enhancers confer tissue- and stage-specificity to V(D)J recombination events. *EMBO J.*, 12: 4335-4346.

Cereghini, S., Herbomel, P., Jouanneau, J., Saragosti, S., Katinka, M., Bourachot, B., DeCrombrughe, B. et M. Yaniv (1983). Structure and function of the promoter-enhancer region of polyoma and SV40. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 47: 935-944.

Chakrabarti, S. et M.M. Seidman (1986). Intramolecular recombination between transfected repeated sequences in mammalian cells is nonconservative. *Mol. Cell. Biol.*, 6: 2520-2526.

Chartrand, P., Gusew-Chartrand, N. et P. Bourgaux (1981). Integrated polyoma genomes in inducible permissive transformed cells. *J. Virol.*, 39: 185-195.

Chomczynski, P. et N. Sacchi (1987). Single-step methode of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-cloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162: 156-159.

Cogen, B. (1978). Virus-specific early RNA in 3T6 cells infected by *tsA* mutant of polyoma virus. *Virology*, 85: 222-230.

Cosloy, S.D. (1979). Effect of transcription of RecBC- and RecF-mediated recombination within the tryptophan operon of *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.*, 139: 1079-1081.

Cowie, A. et R. Kamen (1984). Multiple binding sites for polyomavirus large T antigen within regulatory sequences of polyomavirus DNA. *J. Virol.*, 52: 750-760.

Dailey, L. et C. Basilico (1985). Sequences in the polyomavirus DNA regulatory region involved in viral DNA replication and early gene expression. *J. Virol.*, 54: 739-749.

Delbecchi, L., Gendron, D. et P. Bourgaux (1981). Inducible permissive cells transformed by a temperature-sensitive polyoma virus: superinfection does not allow excision of the resident viral genome. *J. Virol.*, 39: 196-206.

DePamphilis, M.L. (1988). Transcriptional elements as components of eukaryotic origins of DNA replication. *Cell*, 52: 635-638.

de Villiers, J. et W. Schaffner (1981). A small segment of polyomavirus DNA enhances the expression of a cloned β -globin gene over a distance of 1400 base pairs. *Nucleic Acids Res.*, 9: 6251-6264.

Diamond, L. et L.V. Crawford. (1964). Some characteristics of large-plaque and small-plaque lines of polyomavirus. *Virology*, 22: 235-244.

- Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baken, K. et J.S. Mattick (1991). "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.*, 19: 4008.
- Dulbecco, R. et G. Freeman (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology*, 8: 396-397.
- Eckhart, W. (1969). Complementation and transformation by temperature sensitive mutants of polyoma virus. *Virology*, 38: 120-125.
- Eckhart, W. (1974). Properties of temperature-sensitive mutants of polyoma virus. *Cold Spring Harbor Symp.*, 39: 37-40.
- Engler, P., Roth, P., Kim, J.Y. et U. Storb (1991). Factors affecting the rearrangement efficiency of an Ig test gene. *J. Immunol.*, 146: 2826-2835.
- Farmerie, W.G. et W.R. Folk (1984). Regulation of polyomavirus transcription by large tumor antigene. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, 81: 6919-6923.
- Feinberg, A.P. et B. Vogelstein (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 132: 6-13.
- Feinberg, A.P. et B. Vogelstein (1984). ADDENDUM. *Anal. Biochem.*, 137: 266-267.
- Francke, B. et W. Eckhart (1973). Polyoma gene function required for viral DNA synthesis. *Virology*, 55: 127-135.
- Frappier, D., Gendron, D., Bourgaux-Ramoisy, D. et P. Bourgaux (1990). Alternative homologous and nonhomologous products arising from intramolecular recombination. *J. Virol.*, 64: 5058-5065.
- Fried, M. (1965). Cell transforming ability of a temperature-sensitive mutant of polyoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 53: 486-491.
- Fried, M., Griffin, B.E., Lund, E. et D.L. Robberson (1975). Polyomavirus - a study of wild-type, mutant and defective DNAs. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 39: 45-52.
- Galup, C., Herring-Gillam, E., Sylla, B.S. et P. Bourgaux (1984). The temperature-sensitive defect in polyoma virus P155 mutant. *Virus Res.*, 1: 469-476.
- Gélinas, C., Bouchard, L. et M. Bastin (1981). Tumorigenic activity of cloned polyoma DNA in newborn rats. *Experientia*, 37: 1074-1075.

Gélinas, C., Chartrand, P. et M. Bastin (1982). Polyoma virus mutant with normal transforming ability but impaired tumorigenic potential. *J. Virol.*, 43: 1072-1081.

Gendron, D., Delbecchi, L., Bourgaux-Ramoisy, D. et P. Bourgaux (1988). A substitution in a nonconserved region of polyomavirus large T antigen which causes a thermosensitive mutation. *Virology*, 165: 165-171.

Gangloff, S., Lieber, M.R. et R. Rothstein (1994). Transcription, topoisomerases and recombination. *Experientia*, 50: 261-269.

Gottesman, S. et M.E. Gottesman (1975). Elements involved in site-specific recombination in bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.*, 91: 489-499.

Griffin, B.E., Soeda, E., Barrell, B.G. et R. Staden (1981). Sequence and analysis of polyomavirus DNA. Dans J. Tooze (Ed.), *DNA Tumor Viruses*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., p.843-910.

Gu, H., Zou, Y.-R. et K. Rajewsky (1993). Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP mediated gene targeting. *Cell*, 73: 1155-1164.

Haber, J.E. (1992). Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Genet.*, 8: 446-452.

Hendrickson, E.A., Fritze, C.E., Folk, W.R. et M.L. De Pamphilis (1987). The origin of bidirectional DNA replication in polyoma virus. *EMBO J.*, 6: 2011-2018.

Herbomel, P., Bourachot, B. et M. Yaniv (1984). Two distinct enhancers with different cell specificities coexist in the regulatory region of polyoma. *Cell*, 39: 653-662.

Herskowitz, I., Rine, J. et J. Strathern (1992). Mating-type determination and mating-type interconversion in *Saccharomyces cerevisiae*, in: *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae: Gene expression*, Vol2, 5833-657. Eds J.R. Broach, J.R. Pringle and E.W. Jones. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Hirt, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.*, 26: 365-369.

Holmes, D.S. et M. Quigley (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.*, 114: 193-197.

Hsieh, C.-L., McCloskey, R.P. et M.R. Lieber (1992). V(D)J recombination on minichromosomes is not affected by transcription. *J. Biol. Chem.*, 267: 15613-15619.

Hyde-DeRuyscher et G.G. Carmichael (1988). Polyomavirus early-late switch is not regulated at the level of transcription initiation and is associated with changes in RNA processing. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, 85: 8993-8997.

Hyde-DeRuyscher et G.G. Carmichael (1990). Polyomavirus late pre-mRNA processing: DNA replication-associated changes in leader exon multiplicity suggest a role for leader-to-leader splicing in the early-late switch. *J. Virol.*, 64: 5823-5832.

Ikeda, H. et T. Matsumoto (1979). Transcription promotes *recA*-independent recombination mediated by DNA-dependent RNA polymerase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, 76: 4571-4575.

Jenuwein, T., Forrester, W., Qiu, R.-G. et R. Grosschedl (1993). The immunoglobulin mu enhancer core establishes local factor access in nuclear chromatin independent of transcriptional stimulation. *Genes Dev.*, 7: 2016-2032.

Kash, S.F. et R.E. Kellems (1994). Control of transcription arrest in intron I of the murine adenosine deaminase gene. *Mol. Cell. Biol.*, 14: 6198-6207.

Katinka, M. et M. Yaniv (1982). Deletion of N-terminal sequences of polyoma virus T-antigens reduce but do not abolish transformation of rat fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.*, 2: 1238-1246.

Keil, R.L. et G.S. Roeder (1984). *Cis*-acting recombination-stimulating activity in a fragment of the ribosomal DNA of *S. cerevisiae*. *Cell*, 39: 377-386.

Kern, F.G., Pellegrini, S. et C. Basilico (1986). *cis* and *trans*-acting factors regulating gene expression from the polyoma late promoter. In M. Botchan, T. Grodzicker and P. Sharp (ed.), *Cancer Cells*, vol. 4, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Kern, F.G., Bovi, P.D. et C. Basilico (1987). A reiterated leader sequence is present in polyomavirus late transcripts produced by a transformed rat cell line. *J. Virol.*, 61: 4055-4059.

King, P.V. et R.W. Blakesley (1986). Optimizing DNA ligations for transformation. *Focus*, vol. 8, n° 1, p. 1-3.

Kucherlapati, R. et G.R. Smith (1988). Genetic recombination. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Lanoix, J., Tseng, R.W. et N.H. Acheson (1986). Duplication of functional polyadenylation signals in polyomavirus DNA does not alter efficiency of polyadenylation

or transcription termination. *J. Virol.*, 58: 733-742.

Lanoix, J., Tseng, R.W. et N.H. Acheson (1991). Production of polyomavirus late mRNAs requires sequences near the 5' end of the leader but does not require leader-to-leader splicing. *J. Virol.*, 65: 4728-4734.

Lin, F.-L., Sperle, K. et N. Sternberg (1990). Intermolecular recombination between DNAs introduced into mouse L cells is mediated by a nonconservative pathway that leads to crossover products. *Mol. Cell. Biol.*, 10: 103-112.

Liu, Z. et G.G. Carmichael (1993). Polyoma virus early-late switch: regulation of late RNA accumulation by DNA replication. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, 90: 8494-8498.

Liu, S.F. et J.C. Wang (1987). Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, 84: 7024-7027.

Lusky, F.-L. et M. Botchan (1981). Inhibition of SV40 replication in simian cells by specific pBR322 DNA sequences. *Nature*, 293: 79-81.

Martin, M.E., Piette, J., Yaniv, M., Tang, W.-J. et W.R. Folk (1988). Activation of polyomavirus enhancer by a murine activator protein 1 (AP1) homolog and two contiguous proteins. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, 85: 5839-5843.

Muller, W.J., Mueller, C.R. et J.A. Hassell (1983). Polyomavirus origin for replication comprises multiple genetic elements. *J. Virol.*, 47: 586-599.

Munholland, J.M., Kelly, J.J., Hassell, J.A. et A.G. Wildeman (1992). Cell specificity of transcription regulation by papovavirus T antigens and DNA replication. *EMBO J.*, 11: 177-184.

Nault, C., Veilleux, S., Delbecchi, L., Bourgaux-Ramoisy, D. et P. Bourgaux (1994a). Intramolecular recombination in polyomavirus DNA is controlled by promoter elements. *Nucleic Acids Res.*, 22: 485-491.

Nault, C., Fricker, A., Delbecchi, L., Bourgaux-Ramoisy, D. et P. Bourgaux (1994b). Intramolecular recombination in polyomavirus DNA is a nonconservative process directed from the viral intergenic region. *J. Virol.*, 68: 5439-5447.

Nickoloff, J.A. (1992). Transcription enhances intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, 12: 5311-5318.

Nickoloff, J.A. et R. Reynolds (1990). Transcription stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, 10: 4837-4845.

- Nilsson, M., Osterlund, M. et G. Magnusson (1991). Analysis of polyomavirus enhancer-effect on DNA replication and early gene expression. *J. Mol. Biol.*, 218: 479-483.
- Piché, A. et P. Bourgaux (1987a). Resolution of a polyomavirus-mouse hybrid replicon: release of genomic viral DNA. *J. Virol.*, 61: 840-844.
- Piché, A. et P. Bourgaux (1987b). Resolution of a polyomavirus-mouse hybride replicon: viral function required for recombination. *J. Virol.*, 61: 845-850.
- Rautman, G., Glaichenhaus, N., Nahgashfar, Z., Breathnach, R. et M. Rassoulzadegan (1982). Complementation of a *tsa* mutant and replication of a recombinant DNA carrying the viral ori region in mouse cells transformed by polyomavirus. *Virology*, 122: 306-317.
- Rothwell, V.M. et W.R. Folk (1983). Comparison of the DNA sequence of the Crawford small-plaque variant of polyomavirus with those of polyomaviruses A2 and strain A3. *J. Virol.*, 48: 472-480.
- Rubnitz, J. et S. Subramani (1984). The minimum amount of homology required for homologous recombination in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, 4: 2253-2258.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. et N. Arnheim (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354.
- St-Onge, L., Bouchard, L., Laurent, S. et M. Bastin (1990). Intrachromosomal recombination mediated by Papovavirus large T antigens. *J. Virol.*, 64: 2958-2966.
- Schulhof, J.C., Molko, D. et R. Teoule (1987). The final deprotection step in oligonucleotide synthesis is reduced to a mild and rapid ammonia treatment by using labile base-protecting groups. *Nucleic Acids Res.*, 15: 397-416.
- Singer, M. et P. Berg (1991). *Genes and genomes*. University Science Books, Mill Valley Road, CA.
- Soeda, E., Arrand, J.W., Smolar, N. et B.E. Griffin (1979). Sequence from early region of polyoma virus DNA containing viral replication origin and encoding small, middle and (part of) large T antigens. *Cell*, 17: 357-370.
- Sussman, P.J. et G. Milman (1984). Short-term, high-efficiency expression of transfected DNA. *Mol. Cell. Biol.*, 4: 1641-1643.
- Sylla, B.S., Bourgaux-Ramoisy, D. et P. Bourgaux (1980). Induction of viral DNA synthesis in clonal derivatives of a permissive cell line transformed by a temperature-

sensitive polyoma virus. *Virology*, 100: 357-369.

Sylla, B.S., Allard, D., Roy, G., Bourgaux-Ramoisy, D. et P. Bourgaux (1984a). A mouse DNA sequence that mediates integration and excision of polyoma virus DNA. *Gene*, 29: 343-350.

Sylla, B.S., Huberdeau, D., Bourgaux-Ramoisy, D. et P. Bourgaux (1984b). Site-specific excision of integrated polyoma DNA. *Cell*, 37: 661-667.

Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J. et F.W. Stahl (1983). The double strand break repair model for recombination. *Cell*, 33: 25-35.

Tooze, J. (1980). *Molecular Biology of Tumor Viruses. DNA Tumor Viruses*. 2nd edition (rev.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Twigg, A.J. et D. Sherratt (1980). Trans-complementable copy number mutants of plasmid Col E1. *Nature*, 283: 216-218.

Tyndall, C., LaMantia, G., Thacker, M., Favalaro, J. et R. Kamen (1981). A region of polyomavirus genome between the replication origin and the late protein coding sequences is required in *cis* for both early gene expression and viral DNA replication. *Nucleic Acids Res.*, 9: 6231-6250.

van der Ploeg, L.H.T. et R.A. Flavell (1980). DNA methylation in the human globin locus in erythroid and nonerythroid tissues. *Cell*, 19: 947-957.

Veldman, G., Lupton, S. et R. Kamen (1985). Polyomavirus enhancer contains multiple redundant sequence elements that activate both DNA replication and gene expression. *Mol. Cell. Biol.*, 5: 649-658.

Voelkel-Meiman, K. et R.L. Keil (1987). Recombination stimulating sequences in yeast ribosomal DNA correspond to sequences regulating transcription by RNA polymerase I. *Cell*, 48: 1071-1079.

Watt, V.M., Ingles, C.J., Urdea, M.S. et W.J. Rutter (1985). Homology requirements for recombination in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, 82: 4768-4772.

Xu, L., Gorham, B., Li, S., Bottaro, A., Alt, F.W. et P. Rothman (1993). Replacement of germ-line epsilon promoter by gene targeting alters control of immunoglobulin heavy chain class switching. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, 90: 3705-3709.

Yoo, W., Martin, M.E. et W.R. Folk (1991). PEA1 and PEA3 enhancer elements are primary components of the polyomavirus late transcription initiator element. *J. Virol.*, 65: 5391-5400.

Intramolecular recombination in polyomavirus DNA is controlled by promoter elements

Chantal Nault, Stéphane Veilleux, Louis Delbecchi, Danielle Bourgaux-Ramoisy and Pierre Bourgaux*

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec J1H 5N4, Canada

Received August 20, 1993; Revised and Accepted December 22, 1993

ABSTRACT

We show here that intramolecular homologous recombination in polyomavirus (Py) DNA depends upon discrete sequence elements of the viral regulatory region which are believed to regulate transcription initiation and exert little or no *cis*-control over replication. Either deleting the viral early promoter (EP) or inverting the viral late promoter (LP) strongly impairs viral DNA recombination under conditions allowing viral DNA replication to proceed undisturbed. These findings suggest that bi-directional transcription proceeding from the intergenic region favors intramolecular recombination.

INTRODUCTION

Recombination is believed to play an important role in the life cycle of oncogenic viruses such as simian virus 40 (SV40) and Py. Indeed, stable transformation requires integration of the viral DNA into the host cell chromosome, whereas excision of integrated viral sequences can ultimately result in the release of new virus progeny (1). Such excision is believed to require both a functional viral origin of replication or Ori (2) and the supply of LT (3), a multifunctional viral early protein involved in the regulation of viral DNA replication and transcription (4). Thus, it has been proposed that LT prompts integration or excision by converting the viral DNA into a replicating substrate, in which the partly single-stranded growing forks play the role of recombination hotspots (1,5,6). From this model, one might have expected replication to enhance recombination of viral DNA. However, no correlation could be found between the ability of SV40 DNA to recombine, and the ability of this DNA to either replicate or code for LT (3,7). We are studying recombination of Py DNA in permissive mouse cells, using a system in which both the substrate and the product of recombination replicate at closely similar rates. In this system, conversion of substrate into product occurs at high frequency, possibly through a process tracking along the DNA from the viral Ori, such as replication or transcription (8). We report here results consistent with this process being transcription rather than replication. Our findings extend numerous observations indicating that recombination is

often coupled with gene expression, and may thus require transcription (9-16).

MATERIALS AND METHODS

Cells and DNAs

We have described elsewhere the origin of the mouse 3T6 cells and *ts* P155 mutant of Py (17,18). *scop*-T1 cells are mouse cells constitutively synthesizing Py early proteins that allow complementation of Py early mutants for replication (19). RmI and all of its derivatives used in this work originate from pB₁-20 (20), designated here pRmI, a recombinant plasmid obtained by inserting the original RmI at the *Sal*I site of pAT 153. Prior to transfection according to Sussman and Milman (21), each recombinant plasmid was digested with *Sal*II, and the insert was circularized by ligase treatment. Unless specified otherwise, the transfected cells were incubated for 5 days at 33°C, before DNA was extracted by the method of Hirt (22) and digested with *Dpn*I and *Eco*RV prior to electrophoresis and blotting (23).

Mutagenesis

Each deletion mutant was generated by assembling two fragments (Fig. 1) that were synthesized by the polymerase chain reaction (PCR) (24) using A3 Py DNA (25-27) as template, and four oligodeoxynucleotides, i.e. two nonspecific primers and two specific primers. These are listed below, the homology to A2 Py DNA (1) being in each case both underlined and specified in brackets. *Nonspecific primers*. Kp1: 5'-TTGTGTAGGTA-CCGCTGTAT-3' (nt 4686-4705); Kp2: 5'-AGACACTGGTA-CCAAGCGAC-3' (nt 2188-2169). *Specific primers* (x and y). ΔP_e. Bg1: 5'-CGCCAGATCTGTTTGTACAAGTTGCCT-3' (nt 87-61); Bg2: 5'-ACCCAGATCTAGGTGGAA-GCCATGCCT-3' (nt 297-323). ΔBT. Mu1: 5'-AGCGG-ACGCGTCTCTGTTTGTACAAG-3' (nt 82-67); Mu2: 5'-AGCGGACGCGTGCCCCAACCGCCTCTTC-3' (nt 129-145). ΔTC. Mu3: 5'-AGCGGACGCGTAT-CAATTTGGGTGGCC-3' (nt 121-105); Mu4: 5'-AGCGG-ACGCGTACCACCATCATGGATAG-3' (nt 164-180). ΔBTC. Mu1 and Mu4. ΣT. Mu5: 5'-AGCGGACGCGTT-TCAATTTGGGTGGCC-3' (nt 119-104); Mu6: 5'-AGCGG-

*To whom correspondence should be addressed

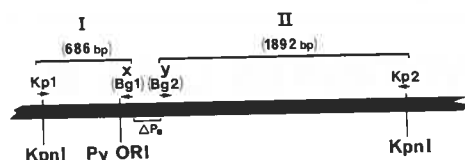


Figure 1. Deleting the EP using PCR. Shown as a black box is a portion of Py DNA encompassing the viral regulatory region. Two sets of primers are used: Two primers (Kp1 and Kp2) encompass the *KpnI* sites, whereas two other primers (x and y) flank the deletion to be generated. The latter two primers include heterology near their 5'-ends in the form of a *Bgl*III (or *Mlu*I) recognition sequence (Materials and Methods). Using Py DNA as template, two separate PCR reactions are performed, one with the Kp1-x pair, and the other with the y-Kp2 pair. Products I and II are digested with *Bgl*III (or *Mlu*I), mixed, ligated, and the fragment including one copy of each product is isolated, digested with *KpnI* and exchanged for the homologous fragment in pRmI. As an example, with *Bgl*I and *Bgl*II as respectively primers x and y, products I and II are of 686 and 1892 bp, and the resulting deletion (bp 80–306, i.e. 227 bp) —or mutant of RmI— is designated ΔP_e (Materials and Methods).

ACGCGTTAGCCCCAACC GCCTCT-3' (nt 128–143). In the last instance (ΣT), once *Mlu*I-digested PCR products I and II had been fused together by ligation (Fig. 1), bp 120–127 had been replaced by a palindromic sequence of identical length (5'-AACGCGTT-3') including the *Mlu*I site (5'-ACGCGT-3'). For all deletion mutants subsequently used in transfections, the organization of the early promoter was verified by sequencing (28).

Inversions of sequences encompassing the late promoter were also generated using PCR. First, a plasmid carrying a mutant RmI lacking the enhancer (pRmIΔE) was generated by replacing the viral *KpnI*-A fragment (1) of RmI with that of pPvu2035, a cloned A2 Py genome from which bp 5028 to 5268 had been deleted to be replaced by a *Xho*I site (29). Then, fragments representing the enhancer were synthesized using A3 Py DNA (25–27) or *ts* P155 Py DNA (17,30) as template, and two primers, each bearing a *Xho*I recognition sequence toward its 5'-end. En1: 5'-AGCGGCTCGAGCTTCAGAAAGATGGCGG-3' (nt 5026–5043); En2: 5'-AGCGGCTCGAGACAGCT-GTTGTCATAG-3' (nt 5271–5256). Following PCR amplification, the desired fragment was purified, digested with *Xho*I, and then ligated to *Xho*I-linearized pRmIΔE. The recircularized eukaryotic inserts from the resulting recombinants were labeled A3+, A3–, P155+ or P155–, depending upon the origin of template DNA used for PCR and the orientation of the PCR-synthesized fragment with respect to the remainder of RmI.

Finally, mutant ΔBTC (see above) was used to generate second generation mutants in which the missing sequences had been reinserted at the site of the deletion, in the plus (+) or the minus (–) orientation. Synthesis of the missing sequence (bp 83–163) from the A3 Py DNA template required two new primers, Mu7 (5'-AGACCACGCGTAGAGGCTGAAATGAGGCG-3', nt 163–147) and Mu8 (5'-AGACCACGCGTGCGCCTTGG-AGGCGC-3', nt 83–99). The *Mlu*I-digested product was reintroduced into ΔBTC at the *Mlu*I site, either in the plus (BTC+) or the minus (BTC–) orientation.

Rate of recombination

Because in our system the substrate for recombination and its product replicate at closely similar rates, the ratio between the amounts of each gives a valid indication on the frequency of

recombination within the transfected substrate. Autoradiograms of blots were scanned with a densitometer (Corning 750 system, and peaks corresponding to the substrate (S) and product (P) were cut out and weighed on a precision balance. The rate of recombination was defined as the P/S+P ratio, expressed as a percentage.

Detection of transcriptional activity

Py CAT and mutant Py CAT molecules were constructed following PCR amplification (24) of part of the viral regulatory region, specifically the sequence extending from bp 4632 to bp 185 through the Ori (1). Primers were synthesized with restriction sites *Bam*HI or *Xho*I at their 5' ends to allow cloning in pBLCAT-6 plasmid (31). ERL1: 5'-GCTGGATCCCGCC-ATGG-3' (nt 4629–4645); CAT2: 5'-CCTGCTCGAGAC-TCTATCCGTGATGGTGG-3' (nt 193–165). Each plate of transfected 3T6 cells received 15 μg of test plasmid and 5 μg of β-galactosidase-encoding plasmid used as an internal control (32).

In vitro transcription was carried out with the deletion mutants of pRmI using HeLa cell nuclear extracts (33). Primer extension analysis was performed with a primer spanning bp 280 to 243 in the Py early region following a previously described method (34).

Coordinates

All DNA coordinates refer to those assigned to A2 Py DNA (1).

RESULTS

Experimental strategy

To study recombination of Py DNA, we make use of RmI, a chimeric replicon including 1.6 kb of mouse DNA and a single copy of the genome of the *ts* P155 mutant of Py, of which however 182 bp are duplicated in the form of the so-called S repeats (Fig. 2). In RmI, high frequency crossing-over between these S repeats generates a single amplifiable product, unit-length Py DNA or P155 (Fig. 2). RmI and P155 both encode the Py early proteins required for activation of the viral replication origin (Ori), and carry two promoters —early (EP) and late (LP)— directing transcription in opposite directions (Fig. 2). However, while EP is a distinct functional entity, LP overlaps with the enhancer, which in the case of Py DNA is required for both transcription and replication (35). Hence, with respect to any given process, the role of EP can be more directly assessed than that of LP. Therefore, we decided to investigate a possible relationship between transcription and recombination by first attempting to alter the function of EP in RmI (Fig. 2). Because we wanted to keep replication going while testing for recombination, we resorted to two different cell systems to analyze our modified RmI molecules: Normal mouse 3T6 cells first, which would allow replication of Py DNA molecules still able to express viral early gene functions, and secondly transformed mouse *scop*-T1 cells synthesizing constitutively Py early proteins and thus supporting the replication of any DNA molecule including a functional Py DNA Ori (19).

EP deletion mutants

Mutant RmI molecules lacking defined elements of the EP were engineered using PCR (Materials and Methods): The *KpnI* fragment of RmI carrying the Ori, EP and LP (Fig. 2) was replaced by a PCR-synthesized fragment carrying a deletion of part or the whole of the EP (see Fig. 1). The resulting deletion

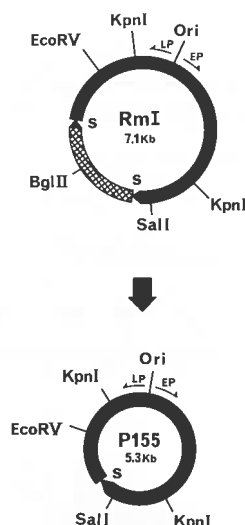


Figure 2. Physical map of RmI and recombination product (P155). RmI consists of mouse DNA (checkered box) and Py DNA (black box), part of which is directly duplicated (S repeats, black arrowheads). The *SalI* site used to clone RmI in pAT153 (Materials and Methods) gives the approximate position of the two polyadenylation signals for the transcripts originating from the opposing viral promoters (EP and LP). Note that this site lies outside the portion of RmI bracketed by *KpnI* sites which contains the viral regulatory region. Monitoring of recombination in RmI is facilitated by RmI and P155 replicating at closely similar rates (8, 20) and being readily separable on blots after digestion with a single-cut enzyme such as *EcoRV* (see Fig. 3B).

mutants of RmI were then transfected (21) into cultures from the two cell lines mentioned in Experimental Strategy. Simultaneous use of both cell lines was important for two main reasons. On one hand, viral early gene products being needed for viral DNA replication, only transcription-competent mutants were expected to replicate in normal 3T6 cells, while all mutants would replicate in *scop*-T1 cells (19). On the other hand, if transcription and recombination were linked, recombination-negative mutants could be unable to replicate in 3T6 cells, in which case only *scop*-T1 cells would allow to identify them. The mutants constructed lacked either the whole of EP plus part of the early coding sequence (ΔP_e), LT-binding site B and the TATA box (ΔBT), the TATA box and LT-binding site C (ΔTC), all three of these regulatory elements (ΔBTC), or only the TATA box (ΣT , Fig 3A); ΣT was so designated because it carried a substitution rather than a deletion of the TATA box (Materials and Methods). Transfection of these mutant molecules revealed two distinct phenotypes. Indeed, only ΔBT was able to replicate in normal 3T6 cells, in which it also recombined, but not as readily as control RmI (Fig. 3B). In *scop*-T1 cells, the same two molecules, RmI and ΔBT , replicated and recombined as in 3T6 cells, while ΔP_e , ΔTC , ΔBTC and ΣT replicated extensively, while failing to recombine detectably. Scanning of various exposures of the blots confirmed these observations (Fig. 3, legend). The tentative conclusion from this experiment was that viral early translation products provided by a *trans*-acting viral genome could allow EP mutants to replicate, but not to recombine. Conceivably however, the *scop*-T1 cells could have been synthesizing limiting amounts of viral early proteins, including LT. A reduced accumulation of substrate DNA would then have resulted in the release of recombination product in amounts too small to be detected. We thus decided

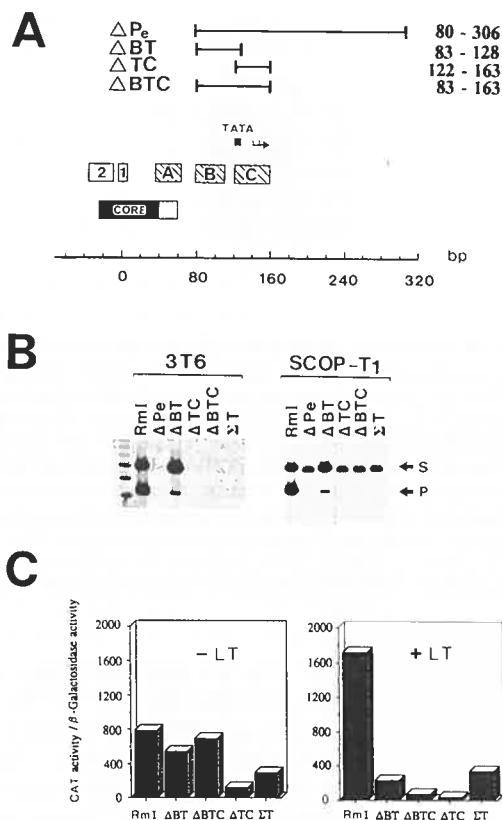


Figure 3. Effect of deleting EP on recombination between the S repeats. A. Functional map of the EP region (56). Deletions characteristic of the various mutants (Δ) are positioned with respect to the Ori core sequence, LT-binding sites A,B,C, 1 and 2, the TATA box, and mRNAs start sites, shown as a branched arrow (58). B. Recombination following transfection. The DNA recovered from the cells transfected with RmI or one of its deletion mutants was digested with *DpnI*, which introduces multiple cleavages in methylated DNA—and *EcoRV*—which cleaves RmI or P155 once (Fig. 2); electrophoresed through a 1% agarose slab gel, blotted and hybridized with a radioactive viral DNA probe. Note that the RmI used as positive control is one in which the *KpnI* fragment encompassing the Ori had been replaced by that of A3 Py DNA (27), so that this RmI would be congeneric with its mutants. S, recombination substrate, P, recombination product. Scanning of the autoradiograms, followed by calculation of the P/S+P ratios (Materials and Methods) and normalization on the highest ratio gave the following values. 3T6: RmI, 100%; ΔBT , 18.2%; *scop*-T1: RmI, 100%; ΔP_e , 1.1%; ΔBT , 8.3%; ΔTC , 1.0%; ΔBTC , 2.4%; ΣT , 1.1%. C. Activity of the EP in wild-type RmI and its deletion mutants, as assessed in the CAT assay (Materials and Methods). Levels of CAT activity were determined according to the butyryl-CoA/organic phase extraction method (59). Values obtained were normalized with the amount of β -galactosidase encoded by the cotransfected control plasmid and are thus expressed as CAT activity divided by the number of β -galactosidase units. Each transfection was done in triplicate. Left panel: basal activity of test plasmids. Right panel: activity of test plasmids cotransfected with 10 μ g of pLT97, a plasmid encoding a mutant LT inactive in DNA replication (39).

to co-transfect mouse 3T6 cells with constant amounts of the deleted constructs and increasing amounts of wild-type Py DNA, thereby providing the EP mutants with increasing amounts of complementing LT. In Fig. 4, we show the results obtained after co-transfecting ΔBT with pPB21, a recombinant plasmid carrying a single copy of A3 Py DNA (27). After transfection, the 3T6 cells were incubated at 39°C, thereby inactivating the thermosensitive LT encoded by ΔBT (30). It is clear from the data that while ΔBT is dependent upon the thermostable LT provided by pPB21 for replication, the amount of recombination

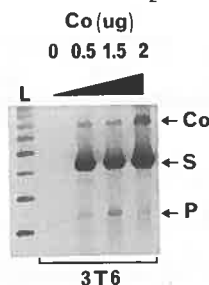


Figure 4. Co-transfection of mutant Δ BT with wild-type Py DNA. Mutant Δ BT (2 μ g) was transfected into 3T6 cells either alone or together with recombinant plasmid pPB21 (27) which includes a single copy of Py DNA. Following 3 days of incubation at 39°C, DNA was extracted (22) and digested with a combination of *DpnI*, *Clal* (to linearize pPB21) and *SmaI* [to linearize Δ BT and its product (30)] prior to electrophoresis and blotting (23). Positions assumed in the gel by the co-transfectant plasmid (Co), Δ BT substrate (S), and its recombination product (S) are indicated by arrows. Note that Δ BT is unable to replicate (at 39°C) in the absence of co-transfectant. Note also that the co-transfectant DNA, in which Py DNA is linked to pBR322 DNA inhibitory to replication (61), is only moderately amplified, while being effective in complementing Δ BT's replication.

product released from Δ BT does not vary appreciably with the amount of pPB21 introduced into the cells (Fig. 4). We felt that this data was most important, since Δ BT was a mutant for which recombination was reduced but still operative. The same experiment was however repeated with the EP mutants which were essentially recombination-negative. There too, co-transfection of 3T6 cells achieved no more than transfection of *scop*-T1 cells in terms of recombination (not shown). In short, EP mutants could be readily complemented for replication but not recombination, whether the complementing genome already resided in the cell, or was co-transfected with the mutant DNA. The fact that, unlike replication, recombination could not be complemented suggested that the latter phenomenon was dependent upon a *cis*-acting function assumed by the EP. For instance, the EP, or more exactly the TATA box since this was the only element missing or altered in all mutants (Fig. 3A), could include a binding site for a regulatory protein essential to recombination. Alternatively, initiation of early transcription would be the *cis*-function assumed by the EP in recombination.

Transcriptional activity of EP mutants

That the majority of our deletions within the EP could reduce transcription to a point where it would strongly curtail viral DNA replication appeared somewhat surprising in view of earlier data from other laboratories (36–38). In an attempt to clarify this issue, we transferred all deleted intergenic regions already tested for their activity in replication/recombination into a plasmid containing the CAT reporter gene (Materials and Methods). Normal 3T6 cells were then transfected with each CAT construct, used either alone, or mixed with a co-transfectant plasmid encoding a mutant LT capable of promoter but not Ori activation (39). In the absence of co-transfection with the LT-encoding plasmid, major differences in CAT gene expression were not noted between the plasmid including the wild-type RmI promoter on one hand, and the plasmids including a deleted promoter on the other hand (Fig. 3C, left; Table I). Co-transfection however, although not followed by an amplification of the CAT plasmids (data not shown), resulted in the wild-type EP being at least five times more effective in generating CAT activity than the least

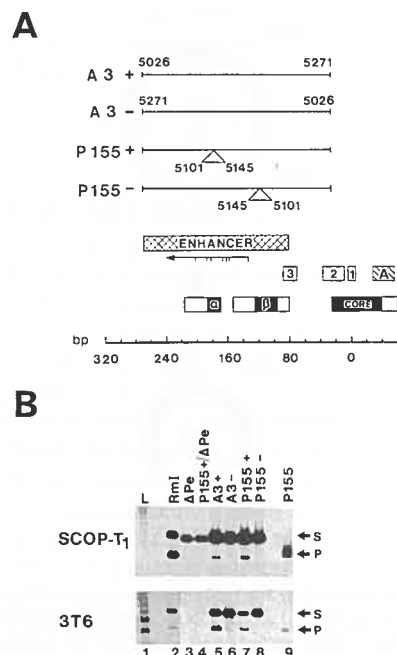


Figure 5. Influence of LP orientation on recombination between S repeats. **A.** Functional map of the LP region. The Ori core and Ori elements α and β , LT-binding sites A, 1, 2 and 3, enhancer and mRNAs start sites (branched arrow) are positioned (58). The DNA fragments introduced in RmI Δ E are also positioned in relation to this map, with the fragment of P155 origin containing two sets of the bp 5101–5145 sequence (60). **B.** Recombination following transfection. Treatment of the DNA recovered from the cells was as in Fig. 3. The Di used for transfection was either a molecule carrying at the *XhoI* site of RmI Δ E one of the fragments identified in A (lanes 5–8), RmI (lanes 2), the Δ P_e mutant of RmI (lanes 3), or its P155+/ Δ P_e mutant (lanes 4) which carries both the P155 enhancer/LP complex in the (+) orientation and the Δ P_e deletion. The DNA run in lane 9 was linear, unit-length, P155 DNA. Scanning of the autoradiograms followed by calculation of the P/S+P ratios (Materials and Methods) and normalization on the highest ratio gave the following values. *scop*-T1: A3+, 64.8%; A3-, 1.9%; P155+, 100%; P155-, 1.9%. 3T6: A3+, 100%; A3-, 3.3%; P155+, 59.4%; P155-, 1.8%.

Table I. Normalized CAT activities^(a)

Origin of Py regulatory region in CAT construct	–LT ^(b)	+LT ^(b)
RmI	100.0	216.0
Δ BT	70.0	29.3
Δ BTC	87.7	8.4
Δ TC	18.8	3.8
Σ T	42.2	42.6

(a) All Y-axis values of the histogram shown in Fig. 3C were re-calculated, assuming that the value obtained for the RmI CAT molecule was 100 (%).

(b) Values for transfections carried out without (–LT) or with (+LT), plasmid pLT97.

handicapped of the deleted EPs (Fig. 3C, right; Table I). Thus, marked differences in CAT activity were observed only under conditions that were not entirely dissimilar with those prevailing in our assay for recombination. Indeed, in *scop*-T1 or co-transfected 3T6 cells for instance, synthesis of LT occurs regardless of whether the transfected DNA was able to direct the synthesis of this protein. Judging from our CAT assays therefore, it appeared likely that LT provided by a complementing

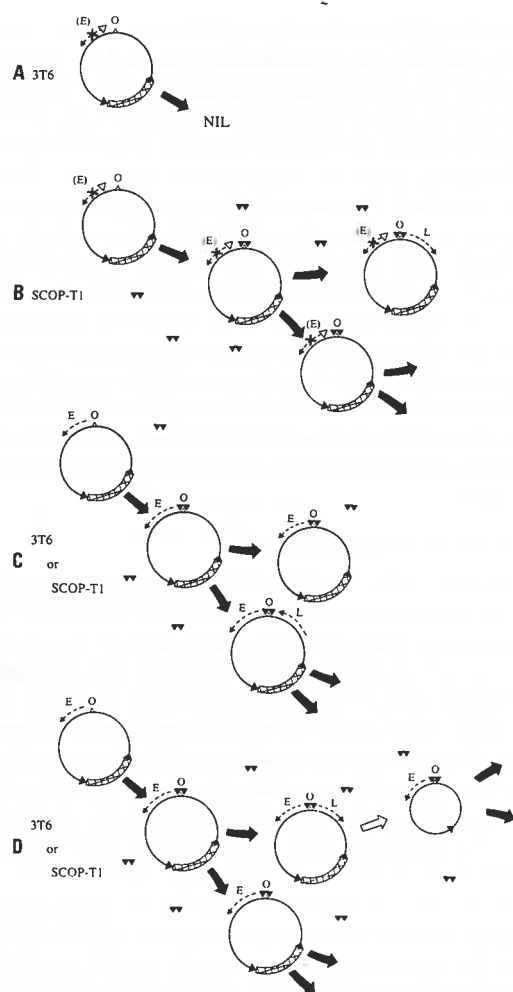


Figure 6. Fate of RmI, wild-type or mutant, in 3T6 and *scop*-T1 cells. **A.** EP mutant RmI in 3T6 cells. Because of the deletion, early transcription (E) and LT synthesis are both reduced, strongly limiting replication (and presumably recombination). **B.** Transfection of EP mutant RmI into *scop*-T1 cells. LT (▼▼) provided by the cell allows replication to take place. However, transcription and thus recombination remain limited. **C.** LP (-) mutant RmI. Early transcription and thus replication proceed normally. However EP and LP are similarly orientated and recombination is inhibited. **D.** Transfection of wild-type or LP (+) mutant RmI. Only those conditions, which allow both early and late transcription to proceed normally, also allow recombination. Because it is only moderately handicapped with respect to transcription, Δ BT is the only EP mutant behaving virtually like wild-type RmI (see Discussion).

Py genome would be largely unable to enhance transcription from any of the deleted EPs. It thus seemed odd that Δ BT which appeared transcriptionally handicapped judging from the CAT assay (Fig. 3C) could not only replicate in 3T6 cells but also recombine—with a reduced efficiency however (Fig. 3B). To further compare the various EP mutants, we thus went back to the mutant DNAs from which the CAT constructs had been derived and subjected them to one more test. In an *in vitro* transcription system (Materials and Methods), Δ BT proved the most active of all EP mutants in directing early transcription, although clearly less active than undeleted RmI (not shown). Obviously then, the EP of Δ BT had reduced activity, but this activity was apparently allowing the synthesis of LT in the amount required for normal viral DNA replication (see Discussion).

LP mutants

We next turned our attention toward the viral late promoter (LP) of RmI. As alluded to earlier (see Experimental Strategy), it would have been difficult to delete LP without inactivating the enhancer, and this would have impaired the ability of the recombination precursor and potential product to replicate. We reasoned that late transcription but not replication would depend upon the orientation of the enhancer/LP complex, and thus undertook to investigate whether the orientation of this complex would have any effect on replication and/or recombination of RmI. First, a mutant RmI lacking the enhancer/LP complex (RmI Δ E) was generated by replacing the *Kpn*I fragment of RmI containing the viral regulatory region by the corresponding fragment of pPvu2035, a cloned A2 Py genome from which bp 5028–5268 have been deleted (26). Secondly, the region extending from bp 5026 to bp 5271 in A3 Py DNA, and the corresponding region of *ts* P155 Py DNA (30), were PCR-amplified using the same set of primers (Materials and Methods). Thirdly, each of the two amplified fragments was inserted at the site of the deletion in RmI Δ E, and recombinant RmI molecules carrying a single copy of either fragment, in one or the other orientation (Fig. 5A), were transfected into 3T6 or *scop*-T1 cells. Rather striking results were thus obtained (Fig. 5B). In both cell lines, all four types of constructs replicated, whether the inserted DNA was in the same (+) or in the opposite (-) orientation as in Py DNA (Fig. 5B). These results were consistent with the inserted enhancer activating replication in either orientation, as anticipated. Furthermore, the fact that the (-) constructs replicated as well as the (+) constructs in 3T6 cells was consistent with early transcription proceeding regardless of the orientation of the enhancer/LP complex. However, (+) and (-) constructs proved different with respect to recombination. While (+) constructs clearly released a product migrating as P155, (-) constructs did so very poorly or not at all (Fig. 5B, lanes 5–8). This difference which was highly reproducible with both cell lines, suggested that not only early transcription but also late transcription was required for stimulation of recombination between S repeats.

In view of these results, we attempted to determine whether inverting the EP would affect recombination. Use of Δ BTC was made for this purpose, as this deletion mutant lacked LT binding sites B and C, the TATA box and mRNA start sites, a set of regulatory sequences that could all be conveniently re-inserted in one block (Fig. 3A). This block of sequences was thus synthesized by PCR and re-introduced in Δ BTC, in either of the two possible orientations (Materials and Methods). Transfection experiments indicated that, regardless of the orientation of the re-introduced sequences, the new mutants were as handicapped as Δ BTC itself with regard to both replication (3T6 cells) and recombination (*scop*-T1 cells). This result was consistent with recombination being dependent upon the EP being functional rather than upon the mere presence of a defined set of sequences, such as the TATA box (see Discussion).

DISCUSSION

EP mutants

Two different methods were used to assess whether the EP of our deletion mutants was functional: *In vitro* transcription of mutant RmI molecules and CAT assays following transfection of recombinant plasmids including the various deleted promoters.

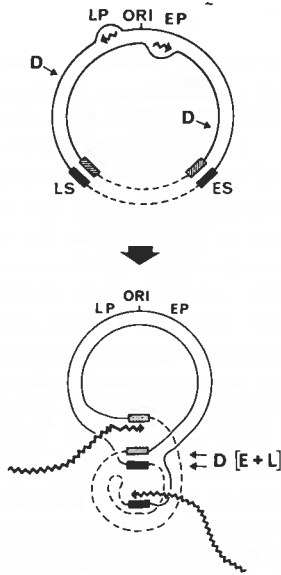


Figure 7. Bidirectional transcription in RmI would displace complementary strands and this may allow them to anneal. Displaced strands (D) are shown by arrows, whereas at the early and late S repeats (ES and LS), sequence complementarity is indicated by using filled and hatched boxes. While the length of DNA displaced by the transcriptional process is clearly exaggerated in this drawing, it should be stressed that the actual value (62) may be somewhat in excess of what is needed for homologous pairing (63).

Under both sets of conditions, all of our mutants displayed reduced EP activity. In the CAT assay, this was particularly evident after co-transfection with a plasmid encoding *trans*-acting LT. This perhaps is not too surprising, since all mutants lacked a TATA box, the binding site for TBP, which is one of the primary targets of several transactivators (40–42). Also, the fact that the deletions were rather precisely aimed at the TATA box may have rendered them both particularly effective in reducing transcription initiation and relatively free of spurious side-effects (43,44). From a comparison of the properties of ΔTC , ΔBTC and ΣT , there appears to exist no obvious relationship between the extent of the deletion and that of the transcriptional defect. To appreciate the significance of this result, one would have to know which effect the binding of LT to sites B and/or C may have on early transcription, which is not the case at the moment (36, 38). A particularly interesting phenotype is that of ΔBT . While transcriptionally handicapped (Fig. 3C), this mutant replicates normally in 3T6 cells (Fig. 3B). Yet, it recombines at a reduced rate (Fig. 3B), a handicap which in co-transfection experiments cannot be relieved by increasing the dosage of wild-type viral DNA (Fig. 4). It is possible that in ΔBT -transfected cells, early transcription, although very much reduced, would still allow the synthesis of LT required for effective viral DNA replication. In the case of SV40, it has been shown that the extent of viral early gene expression required for viral DNA replication varies widely with the host cell (45, 46). If this were also the case for Py, ΔBT might well manage to replicate on its own in 3T6 cells while being nearly as transcriptionally handicapped as the other EP mutants.

LP mutants

The above-discussed results would have been consistent with recombination requiring a unique DNA structure within the EP,

or a protein binding —directly or indirectly— to the TATA box. However, the fact that re-introducing into ΔBTC the sequences deleted from this mutant failed to restore the wild-type phenotype did not support this interpretation. It rather suggested that the ΔBTC deletion had irreversibly impaired a function assumed by the EP region, such as transcription initiation. The results obtained with the LP mutants further support this interpretation. Irrespective of the orientation of the LP, these mutants included all the nucleotides present in wild-type Py DNA or RmI. The (+) and (–) mutants were both fully competent for replication in 3T6 cells, suggesting that neither of the two sequences at the joints of the LP/enhancer complex was critical for early gene expression or replication. Yet the (+) mutants recombined, while the (–) mutants did not. The most straightforward interpretation for this observation is that the orientation of the LP, and thus the direction of transcription, is critical for recombination between the S repeats.

Mechanism of recombination

It thus appears to be significant for recombination in RmI that the EP be functional and the LP correctly orientated. The two promoters are rather different since the LP is a TATA-less promoter (1). It would thus appear unlikely that deleting the EP and inverting the LP would have on RmI structure the same overall effect, which while having no consequence for replication, would preclude recombination. Presumably then, our data would indicate that recombination between the S repeats of RmI is favored by bidirectional transcription (Fig. 6). A relationship between transcription and recombination has already been observed in a number of biological systems (9–16). In mammalian cells, recombination leading to the rearrangement of immunoglobulin-encoding genes is most extensively studied. Much of the information concerning the underlying mechanism is however ambiguous (47–49), and examples of recombination events which are not affected by transcription have been described (48). Hence, it is still unclear whether the mechanism activating immunoglobulin gene rearrangement is transcription, demethylation, chromatin reorganization, or even perhaps replication (50). By comparison, relatively few examples of transcription-dependent homologous recombination have been documented in mammalian cells (14,51). Our system, which allows RmI, a naturally occurring molecule (52), to recombine in a cellular environment permissive for its replication, permits to exclude some mechanisms which conceivably could have facilitated recombination. For instance, recombination does not occur as a mere consequence of replication, as already pointed out. Also, recombination occurs in autonomously replicating Py DNA, which is unmethylated (1), so that demethylation cannot explain recombination. Finally, as already discussed, reliance upon promoter orientation suggests that recombination requires progression of transcription toward the site to be recombined, and not merely a state of the chromatin that is characteristic of transcriptional activity. How may bidirectional transcription assist recombination in RmI? In previous studies by others, it has been proposed that transcription may act on recombination by displacing complementary DNA strands from the sites undergoing crossing-over (10). Actually, RmI may be ideally suited to the development of such an interaction. During transcription proceeding coordinately from both Py promoters, antiparallel DNA strands would be displaced, and once reached the almost symmetrically positioned S repeats, these strands would then be complementary (Fig. 7). Alternatively, bidirectional transcription

could create two 'waves' of positive supercoiling moving ahead of the RNA polymerase, and such waves might favor interaction between the two S repeats (53,54). At present, we are unsure whether experiments can be readily designed to distinguish between these two mechanisms which, incidentally, may not be mutually exclusive. Any intervention that would block transcription elongation would also interfere with the propagation of supercoiling. In closing, we should recall that a linkage between recombination and replication had been initially envisaged for polyomaviruses on the basis of the observed requirement for LT in viral DNA integration and excision (1,3,5,6). At the present time, it however appears likely that LT assumes not only several functions in viral DNA replication, but also a less well-defined role in the regulation of viral DNA transcription, early and late (4). Once a better understanding of this role has been gained, we may be able to understand how LT actuates viral DNA integration, excision (3,55,56), as well as other recombination events (57).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (MRC) to P.B. and D.B.R., while C.N. was the recipient of a MRC studentship. We thank Daniel Gendron for assistance and preparation of the illustrations, Robert Kamen and Marcel Bastin for providing us with pPvu2035 and pLT97, respectively, and Guy Guillemette for critical reading of the manuscript. The expert text editing of Louise Dubois, Andrée Houle and Carole Picard is also acknowledged.

REFERENCES

- Toozee, J., *Molecular Biology of Tumor Viruses* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1980) vol. 2.
- Small, M.B., Gluzman, Y. and Ozer, H.L. (1982) *Nature* **296**, 671–672.
- Miller, J., Bullock, P. and Botchan, M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 7534–7538.
- Fanning, E. (1992) *J. Virol.* **66**, 1289–1293.
- Botchan, M., Topp, W. and Sambrook, J. (1978) *Symp. Quant. Biol. CSH* **43**, 709–719.
- Botchan, M., Stringer, J., Mitchison, T. and Sambrook, J. (1980) *Cell* **20**, 143–152.
- Subramani, S. and Berg, P. (1983) *Mol. Cell. Biol.* **3**, 1040–1052.
- Bourgau, P., Gendron, D. and Bourgau-Ramoisy, D. (1990) *J. Virol.* **64**, 2327–2336.
- Ikeda, H. and Matsumoto, T. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4571–4575.
- Voelkel-Meiman, K., Keil, R.L. and Roeder, G.S. (1987) *Cell* **48**, 1071–1079.
- Schlissel, M.S. and Baltimore, D. (1989) *Cell* **58**, 1001–1007.
- Stewart, S.E. and Roeder, G.S. (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**, 3464–3472.
- Thomas, B.J. and Rothstein, R. (1989) *Cell* **56**, 619–630.
- Nickoloff, J.A. and Reynolds, R.J. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 4837–4845.
- Alessandrini, A. and Desiderio, S.V. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 2096–2107.
- Leung, H. and Maizels, N. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4154–4158.
- Bourgau, P., Delbecchi, L., Yu, K.K.Y., Herring, E. and Bourgau-Ramoisy, D. (1978) *Virology* **88**, 348–360.
- Bourgau, P., Sylla, B.S. and Chartrand, P. (1982) *Virology* **122**, 84–97.
- Rautmann, G., Glaichenhaus, N., Nahgashfar, Z., Breathnach, R. and Rassoulzadegan, M. (1982) *Virology* **122**, 306–317.
- Piché, A. and Bourgau, P. (1987) *J. Virol.* **61**, 840–844.
- Sussman, D.J. and Milman, G. (1984) *Mol. Cell. Biol.* **4**, 1641–1643.
- Hirt, B. (1967) *J. Mol. Biol.* **26**, 365–369.
- Southern, E.M. (1975) *J. Mol. Biol.* **98**, 503–517.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) *Science* **230**, 1350–1354.
- Fried, M., Griffin, B.E., Lund, E. and Roberson, D.L. (1974) *Symp. Quant. Biol. CSH* **39**, 45–52.
- Rothwell, V.M. and Folk, W.R., (1983) *J. Virol.* **48**, 472–480.
- Gélinas, C., Bouchard, L. and Bastin, M. (1981) *Experientia* **37**, 1074–1075.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463–5467.
- Tyndall, C., La Mantia, G., Thacker, C.M., Favaloro, J. and Kamen, R. (1981) *Nucleic Acids Res.* **9**, 6231–6250.
- Gendron, D., Delbecchi, L., Bourgau-Ramoisy, D. and Bourgau, P. (1988) *Virology* **165**, 165–171.
- Boshart, M., Klüppel, M., Schmidt, A., Schütz, G. and Luckow, B. (1992) *Gene* **110**, 129–130.
- Herbomel, P., Bourachot, B. and Yaniv, M. (1984) *Cell* **39**, 653–662.
- Shapiro, D.J., Sharp, P.A., Wahli, W.W. and Keller, M.J. (1988) *DNA* **7**, 47–55.
- Kadonaga, J.T. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 2624–2631.
- de Villiers, J., Schaffner, W., Tyndall, C., Lupton, S. and Kamen, R. (1984) *Nature* **312**, 242–246.
- Bendig, M.M., Thomas, T. and Folk, W.R. (1980) *Cell*, **20**, 401–409.
- Farmerie, W.G. and Folk, W.R. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 6919–6923.
- Dailey, L. and Basilico, C. (1985) *J. Virol.* **54**, 739–749.
- Larose, A., St-Onge, L. and Bastin, M. (1990) *Virology* **176**, 98–105.
- Leong, K., Brunet, L. and Berk, A.J. (1988) *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 1765–1774.
- Abmayr, S.M., Workman, J.L. and Roeder, R.G. (1988) *Genes Dev.* **2**, 542–553.
- Sawadogo, M. and Sentenac, A., (1990) *Ann. Rev. Biochem.* **59**, 711–754.
- Das, G.C., Niyogi, S.K. and Salzman, N.P. (1985) *Prog. in Nucleic Acid Res. and Mol. Biol.*, **32**, 217–236.
- Wasylyk, B., Wasylyk, C., Matthes, H., Wintzerith, M. and Chambon, P. (1983) *EMBO J.*, **2**, 1605–1611.
- Lebkowski, J.S., Clancy, S. and Calos, M.P. (1985) *Nature* **317**, 169–171.
- Lewis, E.D. and Manley, J.L. (1985) *Nature* **317**, 172–175.
- Engler, P., Roth, P., Kim, J.Y. and Storb, U. (1991) *J. Immunol.* **146**, 2826–2835.
- Schlissel, M.S., Corcoran, L.M. and Baltimore, D. (1991) *J. Exp. Med.* **173**, 711–720.
- Schlissel, M., Voronova, A. and Baltimore, D. (1991) *Genes Dev.* **5**, 1367–1376.
- Hsieh, C.L., McCloskey, R.P. and Lieber, M.R. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 15613–15619.
- Nickoloff, J.A. (1992) *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5311–5318.
- Sylla, B.S., Huberdeau, D., Bourgau-Ramoisy, D. and Bourgau, P. (1984) *Cell* **37**, 661–667.
- Liu, L.F. and Wang, J.C. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7024–7027.
- Wu, H.Y., Shyy, S., Wang, J.C. and Liu, L.F. (1988) *Cell* **53**, 433–440.
- Della Valle, G., Fenton, R.G. and Basilico, C. (1982) *Cell* **23**, 347–355.
- Lania, L., Boast, S. and Fried, M. (1982) *Nature* **295**, 349–350.
- Piché, A. and Bourgau, P. (1987) *J. Virol.* **61**, 845–850.
- Hendrickson, E.A., Fritze, C.E., Folk, W.R. and DePamphilis, M.L. (1987) *EMBO J.* **6**, 2011–2018.
- Seed, B. and Sheen, J.-Y. (1988) *Gene*, **67**, 271–277.
- Gendron, D. (unpublished).
- Lusky, M. and Botchan, M. (1981) *Nature* **293**, 79–81.
- Gamper, H.B. and Hearst, J.E. (1982) *Cell* **29**, 81–90.
- Hsieh, P., Camerini-Otero, C.S. and Camerini-Otero, R.D. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6492–6496.

Intramolecular Recombination in Polyomavirus DNA Is a Nonconservative Process Directed from the Viral Intergenic Region

CHANTAL NAULT, ANGÈLE FRICKER, LOUIS DELBECCHI,
DANIELLE BOURGAUX-RAMOISY, AND PIERRE BOURGAUX*

Department of Microbiology, The Medical School, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada J1H 5N4

Received 29 March 1994/Accepted 24 May 1994

Previously, we have studied intramolecular homologous recombination in polyomavirus replicons under conditions allowing only one amplifiable recombination product to be generated from a single precursor molecule. In order to detect putative reciprocal product(s), we have now constructed precursor polyomavirus replicons which contain two copies, instead of one copy, of the viral intergenic region, including the origin of replication as well as both promoters. Upon transfection of mouse cells, constructs containing directly repeated intergenic regions yielded distinct amplifiable products, in number depending upon the functional integrity of both intergenic regions. Our data indicate that of two possible reciprocal products, a given precursor molecule would yield either one or the other but never both at the same time. Most striking, however, is the observation that promoter function is required for recombination, while the origin of replication function may be needed only for amplification of the recombination product once it has been formed. The data reported here confirm and extend previous data suggesting that (i) transcription is instrumental in recombination between direct repeats and (ii) nonconservative recombination involving direct repeats relies upon two promoters of opposing polarities.

In mammalian cells, homologous recombination occurs via a mechanism which is poorly understood. Indeed, one might have expected recombination to be mostly conservative, because a conservative process would allow recombination without loss of genetic information. However, studies aimed at determining the fate of exogenous DNA transfected or inoculated into mammalian cells uniformly yielded results suggesting that elimination of sequence duplications occurred via a nonconservative process (2, 5, 6, 19, 20, 21, 32, 43). The fact that it was considerably stimulated by double-strand DNA breaks (2, 6, 19, 20, 43) made one wonder whether this process, accounted for by some on the basis of a single-stranded annealing (SSA) model (19, 20), was recombination or repair (2). Also, the data just described could indicate that recombination of naked or extrachromosomal DNA is indeed nonconservative (32), while chromosomal DNA would recombine through an altogether different mechanism (44).

Some double-stranded DNA genomes of viral origin provide excellent tools for the study of recombination in mammalian cells. Polyomavirus DNA is one such genome (39). Being a small circular molecule (5.3 kb) encoding only three nonstructural proteins, it is likely to rely heavily on cellular functions for recombination. Also, polyomavirus DNA is complexed in the cell or the virion with histones, as is chromosomal DNA (39). Furthermore, polyomavirus DNA carries many of the regulatory elements found in chromosomes, such as origin of replication (Ori), transcriptional enhancer, promoters, and signals for transcription termination and transcript maturation (39). Presumably, rearrangements of viral sequences that would depend upon both sequence homology and such regulatory elements would be likely to represent authentic recombination. Finally, polyomavirus DNA is known for recombining either

with or within the cellular chromosome, resulting in viral DNA integration or excision, respectively (39). Thus, we study homologous recombination in mouse cells, making use of constructs all derived from RmI (4, 36, 37), a polyomavirus-mouse chimera in which the mouse component is linked to the viral component by two direct viral repeats, 182 bp in length, designated S_1 and S_2 (Fig. 1A). RmI, while excised from the chromosome of a transformed mouse cell (4, 37), also undergoes replication and recombination when transfected into either normal or transformed mouse cells (27, 28), thus yielding unit-length polyomavirus DNA (Py) via a crossover between S_1 and S_2 (Fig. 1A). Such effective conversion of RmI into Py is dependent upon the position of the S_1 and S_2 repeats in relation to the intergenic region (3), and recent results have suggested that such dependence may indicate a requirement for not one but two simultaneous transcription events (25). At any rate, altering the position of the S repeats in RmI, or alternatively deleting one viral promoter or inverting the other promoter, strongly reduces the frequency of recombination between S_1 and S_2 (3, 25).

Because RmI contains a single viral Ori, it could yield only one detectable product, since in our system, a recombination product will not be detected unless it is amplified as readily as Py, or RmI, itself (see Results). To investigate whether recombination in RmI was conservative or nonconservative, we decided to render the potential reciprocal of Py readily detectable, by introducing a viral intergenic region into Ins, the mouse component of RmI (Fig. 1B). We demonstrate in this report that in constructs thus containing two viral intergenic regions, homologous recombination is a tightly regulated process. The occurrence of two directly repeated stretches of DNA is only one of the conditions which these replicons must fulfill to undergo readily detectable recombination. Recombination is directed from both intergenic regions, and activity of two promoters of opposing polarities appears essential to the

* Corresponding author. Phone: (819) 564-5321. Fax: (819) 564-5392.

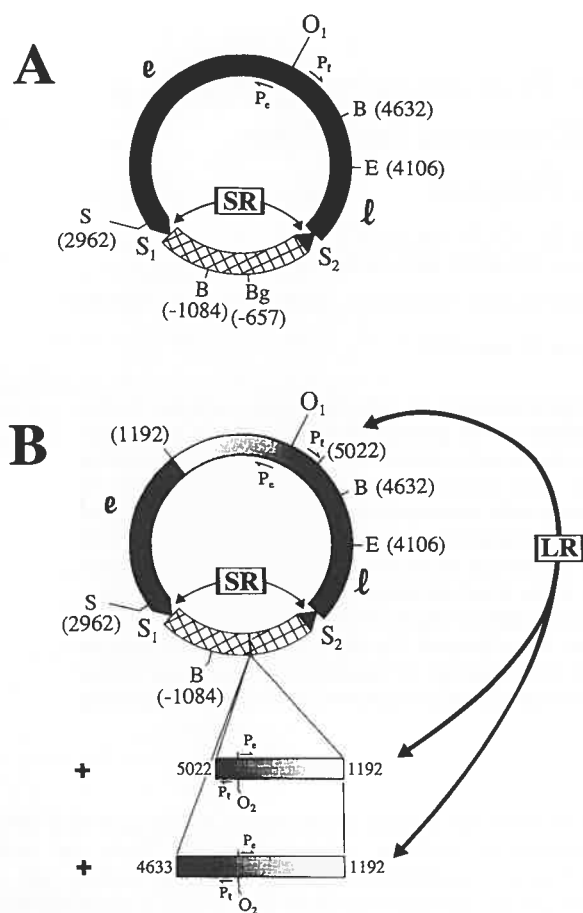


FIG. 1. Templates for intramolecular homologous recombination. (A) RmI is a circular molecule consisting of 1,628 bp (negatively numbered) of mouse DNA (Ins; checked box) inserted in the late coding region (l) of a tsP155 polyomavirus genome (black box), 182 bp of which are directly repeated (S₁ and S₂; black arrowheads). RmI includes one uninterrupted viral early coding region (e). It is able to replicate, yield unit-length viral DNA (Py) through crossing over between S₁ and S₂ (SR), and thus produce virus plaques in mouse cell monolayers (27). Position of the viral Ori (O_i), early promoter (P_e), late promoter (P_t), and recognition sites for restriction endonucleases introducing one (*EcoRV* [E], *Bgl*II [Bg], and *Sal*I [S]) or two (*Bam*HI [B]) scissions in RmI are indicated. (B) Derivatives of RmI including two viral intergenic regions [O(5022/RmI) and O(4633/RmI)]. Use was made of the unique *Bgl*II site to introduce into Ins viral DNA fragments spanning bp 5022 to 1192 or bp 4633 to 1192 (39), so as to form either a direct (+) repetition (as shown) or an inverted repetition (not shown) with the corresponding DNA sequence in RmI. Crossing over between such large repeats (shaded boxes), or LR, could conceivably generate two products, each containing an Ori. Note that the presence of the second regulatory region does not alter the number of restriction sites identified in RmI (see panel A) but that all products possibly arising through either SR or LR will contain at least one such site. Homologies underlying recombination were the following: for SR, 182 bp; and for LR, 1.46 kb (5022 to 1192) and 1.85 kb (4633 to 1192).

process. In contrast, inactivity of the Ori in one of the intergenic regions, while affecting detectability of some of the recombination products, does not appear to affect recombination per se. Finally, recombination was found to be nonconservative, and the conserved sequences were found to include those through which transcription presumably proceeds.

MATERIALS AND METHODS

Cells. We have described elsewhere the origin of the mouse 3T6 and *scop*-T1 cells (28, 29) and the methods used to extract, purify, and characterize low-molecular-weight DNA (4, 27).

Assay for replication-recombination. In all instances, the eukaryotic DNA inserts were excised from recombinant plasmids and recircularized before transfection. Thus, since all inserts had been introduced at the *Sal*I site of pAT153, plasmid DNA (5 µg) was digested with *Sal*I. After heat inactivation of the enzyme (65°C, 20 min), ligation was carried out at 16°C for 18 h in 500 µl of 50 mM Tris-HCl (pH 7.6)–10 mM MgCl₂–1 mM dithiothreitol–1 mM ATP–20 U of T4 DNA ligase (Amersham Corp.). Completeness of each enzyme reaction was monitored by gel electrophoresis of the DNA. The DNA was then transfected into mouse cells (3 µg of DNA per 100-mm-diameter petri dish), using DEAE-dextran with a molecular weight of 500,000 (Pharmacia Fine Chemicals) as already described (27, 35). In every experiment, 3T6 cells and *scop*-T1 cells (see above) were transfected in parallel. Four hours after exposure to DNA, the cultures were treated with 10% dimethyl sulfoxide for 2 min and then incubated at 33°C for 3 or 6 days before DNA extraction (14). After purification, this DNA was digested with *Dpn*I and another restriction enzyme expected to cleave both the eukaryotic precursor DNA and at least some of its recombination products and then subjected to electrophoresis through a 1% agarose slab gel prior to Southern analysis (33). Identical patterns of replication-recombination were always observed at 3 days and 6 days posttransfection; because signals were then stronger, data presented in Results are those obtained after 6 days.

Blotting and hybridization. After gel electrophoresis, the DNA was transferred onto a nylon membrane (Hybond-N⁺; Amersham), using a VacuGene blotting unit from Pharmacia (catalog no. 2016-S1). Hybridization was carried out as already described (41). Radioactive probes were prepared with the Multiprime Random DNA Labelling System from Amersham, using [α -³²P]dCTP (3,000 Ci/mmol; Amersham) as the radioactive precursor. The viral DNA probe was synthesized from either whole polyomavirus DNA or a 515-bp fragment encompassing the Ori. This fragment was generated by PCR using A3 polyomavirus DNA as the template and two primers extending from bp 5019 to 5043 and from bp 183 to 161 (39).

Cloning in *Escherichia coli*. All constructs transfected into tissue culture cells were propagated as inserts in pAT153, which was used to transform *E. coli* DH5 α (Library Efficiency; Bethesda Research Laboratories, Inc.) by the modified Hanahan (11) procedure recommended by the supplier. In general, for simplicity, we refer in this report to the recircularized eukaryotic inserts transfected into the cells rather than to the whole recombinant plasmids. The molecule designated here as RmI was obtained from recombinant plasmid pB₁-20 (27). Two kinds of RmI-derived replicons containing a second viral intergenic region were constructed and designated collectively O(5022/RmI) and O(4633/RmI) (Fig. 1B). To construct O(5022/RmI) replicons, plasmid pPB21, which consists of an A3 polyomavirus genome (8) inserted at the *Bam*HI site of pBR322 (9), was digested with both *Sau*3A and *Taq*I; the viral *Sau*3A fragment containing the viral intergenic region, that is, the fragment extending from bp 5022 to 1192 in A2 polyomavirus DNA (39), was then purified by preparative electrophoresis through an agarose gel. Finally, this fragment was ligated to the *Bgl*II-digested recombinant plasmid carrying RmI as an insert, before transformation of *E. coli* DH5 α . The recombinant plasmids containing the additional sequence from bp 5022 to 1192 in either orientation were the source of RmI-based

replicons designated O(5022, +)/RmI and O(5022, -)/RmI, depending upon whether the two bp 5022–1192 stretches included in the construct constituted direct and inverted repeats, respectively. To produce the O(4633)/RmI replicons, pPB21 was subjected to a complete digestion with *Bam*HI and then partial digestion with *Sau*3A. The fragment extending from bp 4633 (*Bam*HI site) to 1192 (*Sau*3A site) was isolated and introduced at the *Bgl*II site of cloned RmI. Resulting recombinant molecules were the source of replicons designated O(4633, +)/RmI and O(4633, -)/RmI.

The ΔO_2 mutant of O(4633, +)/RmI was generated by PCR (30). Two different sets of primers were used in separate PCRs to generate two distinct fragments from A3 viral DNA used as the template (8). Each set consisted of one primer designed to introduce an alteration in the viral O_2 and of one primer encompassing either the *Bam*HI site at bp 4633 or the *Mbo*I site at bp 1192 (Fig. 1B). Toward their 5' ends, the first primer included a *Cla*I site and the second primer included a *Bam*HI site. After PCR, the two products were separately purified by preparative electrophoresis, mixed, digested with *Cla*I, and joined to one another by ligase treatment. After *Bam*HI digestion and preparative electrophoresis, the fragment expected to extend from bp 4633 to 1192, and thus to contain the modified Ori, was isolated and inserted at the *Bgl*II site of RmI. Sequencing of one of the resulting plasmids, designated ΔO_2 , confirmed that it differed from O(4633)/RmI by the replacement of bp 5281 to 5289 (left part of the core origin; see reference 13) by a *Cla*I site (5'-ATCGAT-3'), such replacement involving not only a 6-bp substitution but also a 3-bp deletion in O_2 . As expected (24), such modification inactivated O_2 (see Results).

The DM mutant of O(4633, +)/RmI was generated with the help of A3-[PI (-)] in this report, an RmI mutant carrying an inversion of the enhancer-late promoter (PI) complex (25), and ΣT , an RmI mutant containing a substitution of the TATA box inactivating the early promoter (Pe) (25). The region spanning bp 4633 to 1192 in PI (-) was PCR amplified by using primers with *Bam*HI sites at their 5' ends. The 1.8-kb fragment thus obtained was treated with *Bam*HI and inserted at the *Bgl*II site of cloned ΣT .

RESULTS

Experimental strategy. As shown in Fig. 1A, RmI contains not only a single viral intergenic region including a functional Ori (O_1) but also a continuous viral early coding region, whereas Ins, its mouse DNA insert, interrupts the viral late coding region. Thus, RmI, as well as unit-length polyomavirus DNA (Py) arising from it through recombination, encode viral early proteins and replicate extensively in permissive mouse cells. From past work, we know that RmI and Py replicate at closely similar rates (3, 4, 7, 27, 28, 37). Thus, when low-molecular-weight DNA is selectively extracted from transfected cells and digested with *Dpn*I and an enzyme introducing a single cut in unmethylated RmI or Py, the Southern procedure (33) allows the detection of two species of 7.1 kb (amplified RmI precursor) and 5.3 kb (amplified Py product). With the derivatives of RmI generated in this work, a greater number of products, and thus bands, was possible (Fig. 1B). For instance, recombination between the S repeats, designated SR (Fig. 1), could generate not one but two amplifiable products, one of which was unable to direct the synthesis of functional viral early proteins (39). Alternatively, recombination between the stretches of DNA including the intergenic regions, designated LR (Fig. 1B), could give rise to another set of two products, again one of which lacked a complete viral

early coding region. To compensate for the differences in coding capacity between the various possible products, we decided to test for replication-recombination not only in normal mouse 3T6 cells but also in *scop*-T1 cells (Materials and Methods). *scop*-T1 cells are permissive mouse cells which constitutively synthesize fully functional polyomavirus early proteins and therefore support the replication of polyomavirus DNA molecules unable to direct such synthesis (29). In our hands, these cells have proved highly reliable in allowing such complementation (3, 25, 28, 41, 42). It should be stressed that whereas the results presented below are those obtained with *scop*-T1 cells, the use of 3T6 cells allowed the detection of essentially the same recombination products for all constructs able to replicate in such cells. Such similarity, which indicates that the viral early proteins supplied by the *scop*-T1 cells actually are not required for the replication of any of the detected recombination products, is actually quite significant (see below).

SR is selective and therefore nonconservative. Use was made of a construct of the O(5022)/RmI series containing the two bp 5022–1192 stretches in the opposite orientation to assess whether SR would give rise to not only the Py, or T (top), product but also its reciprocal, or B (bottom), product (Fig. 2A). The reason for this choice was that since the opposite orientation presumably would preclude or reduce LR (Fig. 1B), SR products would be easier to detect with such a construct. Even though this expectation was met, the pattern of SR observed with O(5022, -)/RmI proved surprising. Indeed, whether RmI or O(5022, -)/RmI was transfected into *scop*-T1 cells and its fate was analyzed as described in Materials and Methods, Py or T was released as the sole recombination product (Fig. 2B). Thus, with O(5022, -)/RmI, the reciprocal of Py, or B product (3.3 kb), which should have been linearized by *Bam*HI (Fig. 2A), was undetectable from the corresponding digest (Fig. 2B, lane B). One trivial explanation for this surprising result was that both T and B were formed but only T was detected, even though the probe used was specific for the portion of the viral genome which would have been common to both T and B (Materials and Methods). Another trivial explanation was that O_2 was unable to promote the replication of the B product, as for instance this product consisted mostly of mouse DNA (Fig. 2A). To test both possibilities, a reconstruction experiment was performed. The recombinant plasmid carrying O(5022, -)/RmI as an insert was subjected to a complete digestion with *Hinc*II. From such digestion, we expected (i) to separate the eukaryotic from the prokaryotic sequences (Materials and Methods) and (ii) to split the O(5022, -)/RmI eukaryotic insert into two fragments, or sets of sequences, each virtually identical to that found either in product T or in product B. Thus, *Hinc*II digestion would release one exclusively viral fragment of 4.8 kb centered on O_1 and one 3.8-kb fragment centered on O_2 , the latter also including the whole of Ins, S_1 , and S_2 (Fig. 2A). The *Hinc*II digest was then divided into two aliquots prior to transfection into *scop*-T1 cells. One aliquot was transfected prior to any further treatment, and the other was first ligase treated under conditions allowing circularization of the *Hinc*II fragments. We presumed that while the ligated DNA was ready for in vivo amplification, the unligated DNA would not become amplified before it would first undergo a conversion into a circular form(s) within the transfected cells. Hence, as both *Hinc*II fragments represented in O(5022, -)/RmI included a *Bam*HI site (Fig. 2A), we treated the DNA recovered from the transfected cells with *Bam*HI before subjecting it to electrophoresis, blotting, and hybridization (Fig. 2C). Quite striking results were thus obtained. First, we noted that the 4.8- and

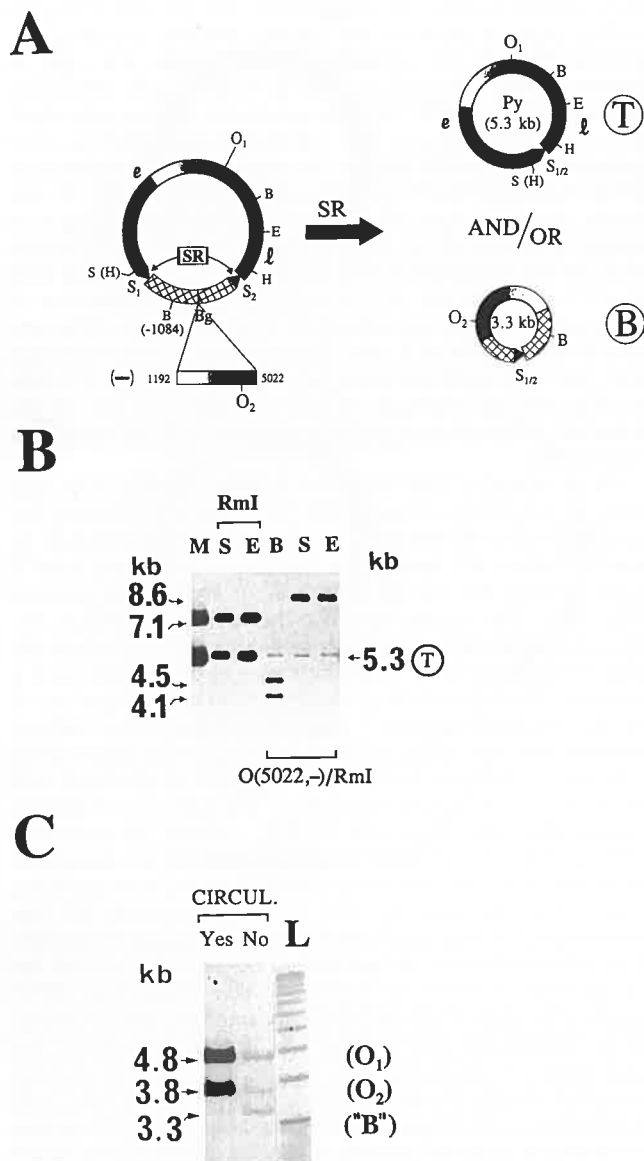


FIG. 2. Recombination in RmI and O(5022, -)/RmI. (A) Map of O(5022, -)/RmI (8.6 kb) and potential T and B products. Symbols are the same as in Fig. 1 except that the positions of the two *HincII* (H) sites have been added. Note that *HincII* cuts O(5022, -)/RmI into two fragments both containing an Ori, a top fragment of 4.8 kb and a bottom fragment of 3.8 kb. (B) Southern transfer of DNA from *scop*-T1 cells transfected with RmI (left) or O(5022, -)/RmI (right). Lane M was run with a 1:1 mixture of RmI and *Py*, both linearized using *SalI* digestion (see panel A). The DNA recovered from the cells was digested first with *DpnI* and then with *SalI* (S), *EcoRV* (E), or *BamHI* (B) before being analyzed by the Southern procedure (33), using a DNA probe specific for the viral Ori (Materials and Methods). Fragments characteristic of precursor DNAs (RmI or O/RmI) are identified at the left, while the only band attributable to a recombination product (T or *Py*, 5.3 kb) is shown at right. Note that *Py* carries a single cleavage site for each of *SalI* (S), *EcoRV* (E), and *BamHI* (B) (see panel A), while *BamHI* cleaves the 8.6-kb precursor DNA into two fragments of 4.5 and 4.1 kb. Note that while the B product carries a *BamHI* site (see panel A), a 3.3-kb band is absent from the extract digested with *BamHI* (lane B). (C) Transfection of *HincII* fragments of O(5022, -)/RmI into *scop*-T1 cells. Before transfection, the *HincII* fragments had been circularized (Yes) or not circularized (No) with ligase. The DNA recovered from the cells was digested with *DpnI* and *BamHI* prior to performance of the same Southern analysis as in panel

3.8-kb circular forms produced by the commercial ligase and including O₁ and O₂, respectively (Fig. 2A), had been amplified to the same extent following transfection (Fig. 2C, lane Yes). This could only mean that O₂ was as effective as O₁ in promoting replication of surrounding sequences which were virtually those of the B and T products (Fig. 2A). Second, with the cells transfected with nonligated DNA, the 4.8- and 3.8-kb bands were also detectable, although very faint (Fig. 2C, lane No). This observation indicated that in vivo circularization of *HincII* fragments was rather ineffective or, alternatively, that exonucleolytic degradation of linear DNA had proceeded in vivo much faster than DNA circularization. Third, with the unligated DNA, a third band, with an apparent molecular size of 3.3 kb, was also detectable (Fig. 2C, lane No). This finding indicated that unlike the circularized 3.8-kb fragment, the linear 3.8-kb fragment would give rise to a molecular species similar to the B product which circular O(5022, -)/RmI had failed to release (Fig. 2B). Absence of this 3.3-kb species after transfection with the ligated *HincII* digest was then particularly significant in view of the high prominence of the 3.8-kb species in the same cell extract (Fig. 2C, lane Yes). Thus, it was clear that either O(5022, -)/RmI or its 3.8-kb subspecies would not generate a detectable 3.3-kb, or B, product unless they were transfected as linear DNA. However, no such requirement existed for the release of the T product from O(5022, -)/RmI. Therefore, the recombination pattern which we had observed with O(5022, -)/RmI, or SR, could be explained only on the basis of the SSA model (see reference 19) if at least one additional assumption was made (see Discussion). Indeed, in the simplest application of the SSA model, one would have expected circular O(5022, -)/RmI to yield both a T and a B product, since O₁ and O₂ were equally functional when separate (Fig. 2C, lanes Yes and No). In particular, generation of a pseudo-B product following transfection of linear *HincII* fragments suggested that a B product should have arisen from a process initiated in circular DNA by a double-strand break(s) followed by exonuclease digestion.

scop-T1 cells were also transfected with O(5022, +)/RmI molecules, in which the bp 5022–1192 stretches were directly repeated (Materials and Methods). There too, replication of the precursor molecule was accompanied by a detectable accumulation of the T but not the B product (not shown). However, products expected from crossing over between the bp 5022–1192 stretches were now detectable in addition to T (not shown), confirming that repeat orientation was critical for recombination. Such recombination between large stretches of DNA including the intergenic regions (or LR) is analyzed in detail below.

LR yields reciprocal products in similar amounts. Detection of LR implied the use of constructs containing directly repeated sequences, such as O(5022, +)/RmI (Fig. 1B; see above). However, O(5022, +)/RmI proved somewhat cumbersome for the demonstration of LR, as digestion with some restriction enzymes, such as *BamHI*, converted the products of LR into linear species comigrating with the fragments from the precursor molecule (Fig. 1B). Hence, we decided to switch to O(4633, +)/RmI (Fig. 1B), which, if subjected to alternatively SR or LR, could conceivably yield a total of four readily

B. Lane L, molecular weight marker. The 4.8-kb species includes O₁, and the 3.8-kb species includes O₂. The 3.3-kb species in lane No is analogous to product B (see panel A). For a visual representation of the principle of an experiment similar to that shown in Fig. 2C, see Fig. 4A.

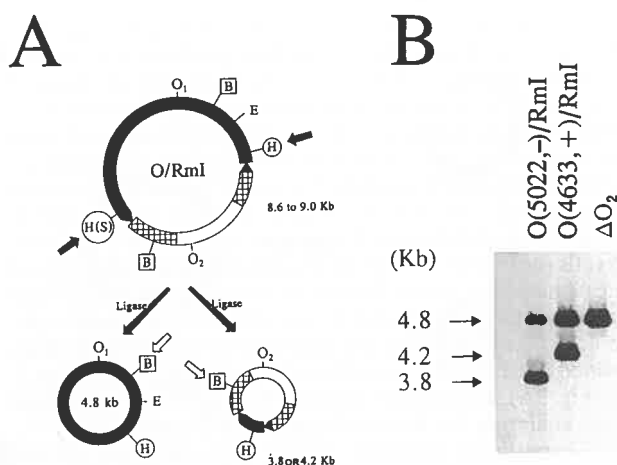


FIG. 4. Functionality of Oris in constructs of the O/RmI series. (A) The assay. The construct (top) is digested with *HincII* (H; black arrows) and thus converted into two fragments, each encompassing the Ori, O₁, or O₂. The fragments are circularized by ligase treatment and transfected as a mixture into *scop*-T1 cells. After 6 days of incubation at 33°C, DNA is Hirt extracted (14) and digested with *Bam*HI (B; white arrows), which then linearizes both of the two replicons containing, respectively, O₁ and O₂. Note that the species carrying O₂ varies in size with the construct, whereas the size of the species including O₁ is constant (4.8 kb). S, *Sal*I; E, *Eco*RV. (B) DNA recovered from cells transfected with circularized *HincII* fragments from O(5022, -)/RmI, O(4633, +)/RmI, and ΔO₂. This DNA was digested with *Bam*HI prior to electrophoresis (see panel A). Note the 4.8-kb species (including O₁) common to all three samples, as well as species (including O₂) of 3.8 kb for O(5022, -)/RmI and 4.2 kb for O(4633, +)/RmI; this 4.2-kb species is not observed with ΔO₂. Thus, (i) O₂ is inactivated by the ΔO₂ deletion and (ii) intermolecular homologous recombination between the 4.8-kb species and the 4.2-kb species does not occur at high frequency. Indeed, this would have made both species detectable, just as intramolecular recombination rendered detectable both LR products of ΔO₂ (Fig. 3B, right). Notice that with the exception of this 4.2-kb product from ΔO₂, molecular species including O₁ and O₂ appear to have replicated at closely similar rates after transfection. Since the two species originate from the same construct by successive *HincII* and ligase treatments, relative intensities of the two bands cannot depend upon variability of transfection efficiency.

both L and R products from ΔO₂ indicated that LR resulted from crossover between any two corresponding sites within the homologous sequences surrounding the Oris. Indeed, a significant bias in the selection of crossover sites would have caused O₂ to end up preferentially in either L or R, making this product less readily detectable. Thus, both SR and LR were processes unresponsive to O₂ function. Furthermore, since any amplifiable product would necessarily include O₁, a single precursor molecule could never release an L product and an R product, both amplifiable. However, as LR might have consistently released two products, one amplifiable and one nonamplifiable, we still had not proven that LR was nonconservative. This ambiguity is clarified in the next section.

LR, while being nonselective, is also nonconservative. In a previous report (25), we have shown that in RmI, SR is dependent upon the functional integrity of both viral promoters, P_e and P_i (Fig. 1A). For instance, a given substitution of the TATA box (ΣT) in P_e, while strongly depressing early transcription, would also strongly restrict SR; similarly, an inversion of P_i [P_i (-)] markedly restricted SR (25). Neither of these mutations, however, had any detectable impact on Ori

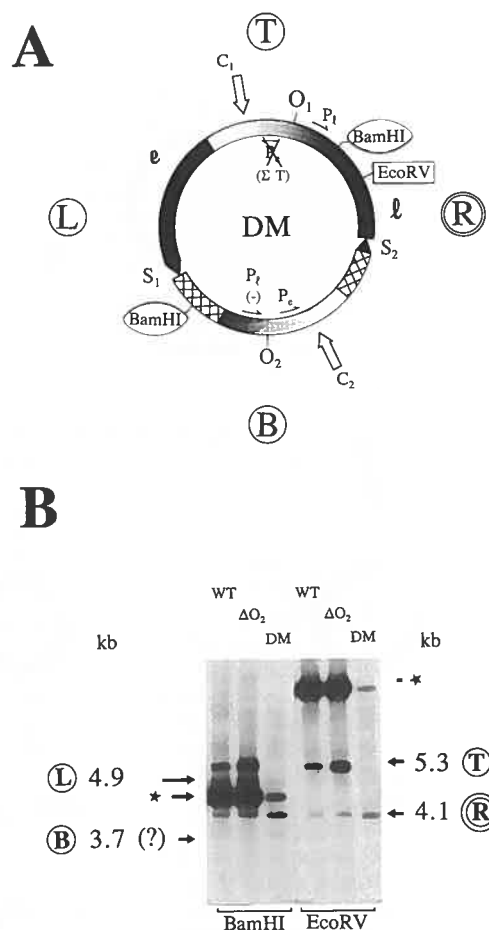


FIG. 5. Recombination in DM. (A) Map of DM. The symbols are those used previously. Note that DM differs from O(4633, +)/RmI in only two respects: a substitution of the TATA box (ΣT) in the P_e adjacent to O₁ and an inversion [P_i (-)] of the P_i adjacent to O₂. Sequences that are the sources of the four potential products T, R, B, and L (in a clockwise order) are positioned. Note the positions of two matching sites (C₁ and C₂) which, if subjected to crossing over, could yield L and/or R. (B) Recombination of DM in *scop*-T1 cells. O(4633, +)/RmI (wild type [WT]) and ΔO₂ had been transfected in parallel cultures to serve as controls. Note that controls recombine as observed before (Fig. 3B), but that DM yields R (4.1 kb) as the sole recombination product. Bands marked by stars originate from the recombination template. The two mutations together reduce the homology presumably conducive of LR by about 15%. This result is highly reproducible and not a mere reflection of inadequate recircularization of the DM insert after excision from the corresponding recombinant DNA.

function (25). We thus decided to transfer these mutations into O(4633, +)/RmI. As already found for RmI, either mutation blocked SR (that is, the release of the T product) when introduced in the intergenic region of O(4633, +)/RmI including O₁; furthermore, any single mutant generated from O(4633, +)/RmI displayed undisturbed LR, whether the mutation mapped near O₁ or O₂ (7a). Strikingly different results were obtained with a double mutant such as DM, in which the ΣT substitution flanks O₁ and the P_i (-) inversion flanks O₂ (Fig. 5A). A comparison of the recombination patterns observed for ΔO₂ and DM was particularly informative in this regard (Fig. 5B). While including only one functional Ori, ΔO₂ yielded both L and R, as already observed (Fig. 3B). In

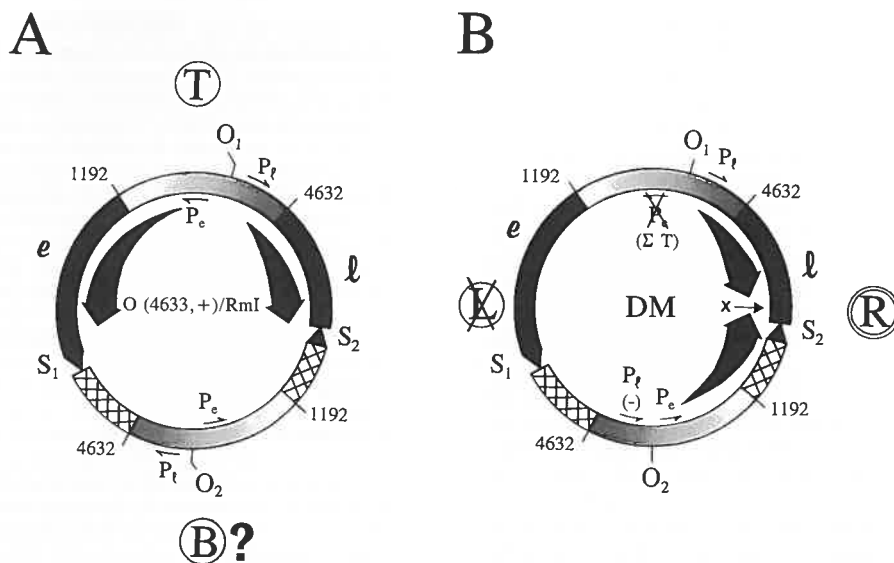


FIG. 6. Possible relationship between SR or LR and transcription. (A) SR in O(4633)/RmI. Transcription progressing over some distance from the P_e and P_t flanking O_1 results in the accumulation of positive supercoils ahead of the two transcription complexes. Positive supercoiling increases as transcription progresses, as shown by the widening of the large black arrows. Hence, the only sites with sequences and configurations compatible with crossing over are S_1 and S_2 , and product T is formed (the same process starting from the opposite intergenic region would yield product B). (B) LR in DM. As a result of two promoter alterations, only two transcriptional complexes can simultaneously proceed, converging initially through nonhomologous DNA sequences, as indicated. If and when these transcriptional complexes pass by one another (X is the midpoint between the two presumably active promoters), positive supercoils start accumulating in the untranscribed (or left) portion of the molecule. Crossover can then occur between any two matching sites included in the shaded boxes (see also white arrows in Fig. 5A). The R product is then formed. In the absence of either the ΣT or the P_t (-) mutation, the left portion of the molecule will be positioned immediately downstream of an active promoter, and such simple mutant constructs yield not only the R product but also the L product (see Results).

contrast, DM, in which both Oris were functional, generated only R (Fig. 5B). This finding indicated that LR could not be more readily reconciled with the SSA model (19) than SR. Since neither the ΣT substitution nor the P_t (-) inversion affected the function of the adjacent Ori (25), we would have expected from this model that DM would yield both L and R. Of course, both of the mutations in DM cause a disruption of the homology which, in wild-type and ΔO_2 DNA, is likely to play a role in the generation of the L and R products. However, since L is the reciprocal of R, it is not obvious at first how interruption of this homology could preclude the formation of L while allowing that of R. It will also be noted that bands attributable to the DM precursor are relatively weak and that those attributable to its R product are thus comparatively strong. This reproducible pattern could reflect either one of two conditions. First, poor replication of the substrate could favor recombination, as already observed with some constructs (27). However, why DM should replicate poorly is at present unclear. Alternatively, the structure of promoters in DM might render it unable to give rise to more than one recombination product (see Discussion and Fig. 6), and this would make the release of R, or the disappearance of the precursor, all the more effective. These two interpretations are not mutually exclusive. It remains that whereas the reason for its phenotype is not completely clear, DM generates only R. Thus, in DM at least, LR clearly is nonconservative.

DISCUSSION

In this report, we document the occurrence in complex eukaryotic replicons, including two polyomavirus intergenic regions, of two recombination pathways designated SR and LR. These pathways could be readily identified because they

yield homologous recombination products of different sizes. It is as yet unclear to what extent the two pathways rely on similar or different mechanisms, but some data suggest that they are actually related but distinct in their requirements (see below). One thing is clear about both, however: they cannot result from the work of cellular enzymes such as nucleases and ligases acting directly on the transfected circular DNA, even before it can be replicated and/or transcribed. Since the process being studied is intramolecular, the effect of these enzymes would be to reduce the number of repeated sequences from two sets to one while also eliminating one of the two intervening sets of unique sequences. As this presumably would be a random process, it would systematically yield the T product with the B product and the L product with the R product. In Fig. 2, 4, and 5, we provide ample evidence that whether SR or LR is considered, these pathways often, but not always, give rise to fewer products than expected from the rather simple mechanism that we have just outlined. In our opinion, this indicates that recombination in molecules of the O/RmI series is *cis* regulated, an interpretation which is consistent with the effect of alterations of the viral intergenic region on recombination (reference 25 and this work). Transcription has already been proposed by several groups (1, 16, 18, 26, 31, 34, 38, 40) to be an activator of recombination, and several models linking the two phenomena have already been considered (16, 26, 38). We believe that our results also suggest that sequences regulating transcription, rather than those regulating replication, are likely to influence recombination, whether SR or LR is considered.

Earlier results had suggested to us that SR is a process in which pairing precedes strand exchange (3, 7, 41, 42), as would be expected from the properties of some known eukaryotic

recombinases (15). Transcription could conceivably stimulate recombination by producing a DNA structure that favors interactions between homologous duplexes present at two distinct sites on the same molecule. It was first proposed and then demonstrated that as transcription proceeds, DNA ahead of the RNA polymerase becomes positively supercoiled, while DNA behind it accumulates negative supercoils (10, 17, 22, 46). If in O(4633, +)/RmI, for instance, both promoters were simultaneously activated in the same intergenic region, S₁ and S₂ would each be hit by one of the two waves of supercoiling moving in opposite directions from that Ori (46) and SR would ensue (Fig. 6A). If, on the contrary, transcription were to be initiated simultaneously at two differently oriented promoters, but each in a different intergenic region, the accumulation of positive supercoils, instead of occurring at the top or the bottom of the molecule (see Fig. 3A), could occur left or right of the DNA having undergone transcription, thus resulting in LR (Fig. 6B and 5A). With respect to the role of transcription in recombination, it should be noted that transcription may drive pairing between homologous sequences not only by the mechanism envisaged here but also by another one which assumes interaction between displaced and complementary single strands (25). It could also create conditions leading to breakage and reunion by topoisomerases. Even so, transcription and pairing should occur first and breaking should occur second, as breaking would be likely to inhibit transcription initiation (12, 23, 45). This interpretation in no way directly challenges the SSA model (19, 20) but implies that recombination occurring as proposed in that model would have to occur after initiation of transcription. Actually, positive supercoiling downstream of the transcription complexes could favor not only pairing of homologous sequences but also breaking of the DNA, possibly by topoisomerases. This would be one way to reconcile our data with the SSA model.

We wish to conclude by commenting on a difference between SR and LR which we cannot account for at present. Even when both of the intergenic regions in constructs of the O/RmI series are seemingly intact while similarly oriented, LR always gives rise to two products, while SR occasionally gives rise to only one, Py. It should be pointed out that the sequences in the precursor from which Py arises represent a full viral genome, while the sequences in the reciprocal of Py include only about one-third of the viral genome. Conceivably, the bp 5022–1192 stretch, or even the bp 4633–1192 stretch, of polyomavirus DNA could lack some accessory element(s) enhancing recombination. If this were the case, such an element(s) would be influential over only a short distance on the DNA and thus sometimes not effective enough to allow for the emergence of a single product, the reciprocal of Py. Action over a short distance seems to be the most probable explanation, since Py, and thus O/RmI, must contain at least one copy of the hypothetical accessory element, and this copy seems to be sufficient to make the two products of LR, L and R, equally prominent. Alternatively, the accessory element could influence SR but not LR, in which case SR and LR would be intrinsically, although perhaps not markedly, different.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (MRC) to P.B. and D.B.-R., including a University-Industry grant funded jointly by MRC and Pharmacia Inc. C.N. was the recipient of an MRC studentship, and A.F. was the recipient of an FCAR studentship.

We thank Claudio Basilico and Bill Folk for discussion, Raymund Wellinger for constructive criticism, Catherine Massé and Andrée Houle for text editing, and Daniel Gendron for preparation of the figures.

REFERENCES

- Alessandrini, A., and S. V. Desiderio. 1991. Coordination of immunoglobulin DJ_H transcription and D-to-J_H rearrangement by promoter-enhancer approximation. *Mol. Cell. Biol.* 11:2096–2107.
- Anderson, R. A., and S. L. Eliason. 1986. Recombination of homologous DNA fragments transfected into mammalian cells occurs predominantly by terminal pairing. *Mol. Cell. Biol.* 6:3246–3252.
- Bourgau, P., D. Gendron, and D. Bourgau-Ramoisy. 1990. Preferred crossover sites on polyomavirus DNA. *J. Virol.* 64:2327–2336.
- Bourgau, P., B. S. Sylla, and P. Chartrand. 1982. Excision of polyoma virus DNA from that of a transformed mouse cell: identification of a hybrid molecule with direct and inverted repeat sequences at the viral-cellular joints. *Virology* 122:84–97.
- Brouillette, S., and P. Chartrand. 1987. Intramolecular recombination assay for mammalian cells that produces recombinants carrying both homologous and nonhomologous junctions. *Mol. Cell. Biol.* 7:2248–2255.
- Chakrabarti, S., and M. M. Seidman. 1986. Intramolecular recombination between transfected repeated sequences in mammalian cells is nonconservative. *Mol. Cell. Biol.* 6:2520–2526.
- Frappier, D., D. Gendron, D. Bourgau-Ramoisy, and P. Bourgau. 1990. Alternative homologous and nonhomologous products arising from intramolecular recombination. *J. Virol.* 64:5058–5065.
- Fricker, A., C. Nault, L. Delbecchi, and P. Bourgau. Unpublished data.
- Fried, M., B. E. Griffin, E. Lund, and D. L. Robberson. 1975. Polyoma virus—a study of wild-type, mutant and defective DNAs. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39:45–52.
- Gélinas, C., L. Bouchard, and M. Bastin. 1981. Tumorigenic activity of cloned polyoma DNA in newborn rats. *Experientia* 37:1074–1075.
- Glaever, G. N., and J. C. Wang. 1988. Supercoiling of intracellular DNA can occur in eukaryotic cells. *Cell* 55:849–856.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557–580.
- Harland, R. M., H. Weintraub, and S. L. McKnight. 1983. Transcription of DNA injected into *Xenopus* oocytes is influenced by template topology. *Nature (London)* 302:38–43.
- Hendrickson, E. A., C. E. Fritze, W. R. Folk, and M. L. DePamphilis. 1987. The origin of bidirectional DNA replication in polyoma virus. *EMBO J.* 6:2011–2018.
- Hirt, B. 1967. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.* 26:365–369.
- Hsieh, P., and R. D. Camerini-Otero. 1989. Formation of joint DNA molecules by two eukaryotic strand exchange proteins does not require melting of a DNA duplex. *J. Biol. Chem.* 264:5089–5097.
- Ikeda, H., and T. Matsumoto. 1979. Transcription promotes *recA*-independent recombination mediated by DNA-dependent RNA polymerase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4571–4575.
- Lee, M.-S., and W. T. Garrard. 1991. Positive DNA supercoiling generates a chromatin conformation characteristic of highly active genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9675–9679.
- Leung, H., and N. Maizels. 1992. Transcriptional regulatory elements stimulate recombination in extrachromosomal substrates carrying immunoglobulin switch-region sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4154–4158.
- Lin, F.-L. M., K. Sperle, and N. Sternberg. 1984. Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. *Mol. Cell. Biol.* 4:1020–1034.
- Lin, F.-L. M., K. Sperle, and N. Sternberg. 1990. Intramolecular recombination between DNAs introduced into mouse L cells is mediated by a nonconservative pathway that leads to crossover products. *Mol. Cell. Biol.* 10:103–112.
- Lin, F.-L. M., K. M. Sperle, and N. L. Sternberg. 1987. Extrachromosomal recombination in mammalian cells as studied with single- and double-stranded DNA substrates. *Mol. Cell. Biol.* 7:129–140.
- Liu, L. F., and J. C. Wang. 1987. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7024–7027.
- Luchnik, A. N., T. A. Hisamutdinov, and G. P. Georgiev. 1988.

- Inhibition of transcription in eukaryotic cells by X-irradiation: relation to the loss of topological constraint in closed DNA loops. *Nucleic Acids Res.* **16**:5175-5190.
24. Luthman, H., M.-G. Nilsson, and G. Magnusson. 1982. Non-contiguous segments of the polyoma genome required in *cis* for DNA replication. *J. Mol. Biol.* **161**:533-550.
25. Nault, C., S. Veilleux, L. Delbecchi, D. Bourgaux-Ramoisy, and P. Bourgaux. 1994. Intramolecular recombination in polyomavirus DNA is controlled by promoter elements. *Nucleic Acids Res.* **22**:485-491.
26. Nickoloff, J. A., and R. J. Reynolds. 1990. Transcription stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **10**:4837-4845.
27. Piché, A., and P. Bourgaux. 1987. Resolution of a polyomavirus-mouse hybrid replicon: release of genomic viral DNA. *J. Virol.* **61**:840-844.
28. Piché, A., and P. Bourgaux. 1987. Resolution of a polyomavirus-mouse hybrid replicon: viral function required for recombination. *J. Virol.* **61**:845-850.
29. Rautmann, G., N. Glaichenhaus, Z. Nahgashfar, R. Breathnach, and M. Rassoulzadegan. 1982. Complementation of a *tsa* mutant and replication of a recombinant DNA carrying the viral *ori* region in mouse cells transformed by polyoma virus. *Virology* **122**:306-317.
30. Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**:1350-1354.
31. Schlissel, M. S., and D. Baltimore. 1989. Activation of immunoglobulin kappa gene rearrangement correlates with induction of germline kappa gene transcription. *Cell* **58**:1001-1007.
32. Seidman, M. M. 1987. Intermolecular homologous recombination between transfected sequences in mammalian cells is primarily nonconservative. *Mol. Cell. Biol.* **7**:3561-3565.
33. Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517.
34. Stewart, S. E., and G. S. Roeder. 1989. Transcription by RNA polymerase I stimulates mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **9**:3464-3472.
35. Sussman, D. J., and G. Milman. 1984. Short-term, high-efficiency expression of transfected DNA. *Mol. Cell. Biol.* **4**:1641-1643.
36. Sylla, B. S., D. Allard, G. Roy, D. Bourgaux-Ramoisy, and P. Bourgaux. 1984. A mouse DNA sequence which mediates integration and excision of polyoma virus DNA. *Gene* **29**:343-350.
37. Sylla, B. S., D. Huberdeau, D. Bourgaux-Ramoisy, and P. Bourgaux. 1984. Site-specific excision of integrated polyoma DNA. *Cell* **37**:661-667.
38. Thomas, B. J., and R. Rothstein. 1989. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* **56**:619-630.
39. Toozé, J. 1980. Molecular biology of tumor viruses, vol. 2. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
40. Voelkel-Meiman, K., R. L. Keil, and G. S. Roeder. 1987. Recombination-stimulating sequences in yeast ribosomal DNA correspond to sequences regulating transcription by RNA polymerase I. *Cell* **48**:1071-1079.
41. Vu, H. K., L. Delbecchi, D. Bourgaux-Ramoisy, and P. Bourgaux. 1991. The same mammalian replicon yields distinct recombination products in different cell lines. *J. Biol. Chem.* **266**:9320-9326.
42. Vu, H. K., L. Delbecchi, M. Quévillon, E. Herring-Gillam, and P. Bourgaux. 1992. Crossover site selection during recombination of mammalian replicons. *J. Virol.* **66**:3210-3213.
43. Wake, C. T., F. Vernaleone, and J. H. Wilson. 1985. Topological requirements for homologous recombination among DNA molecules transfected into mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **5**:2080-2089.
44. Waldman, A. S., and R. M. Liskay. 1987. Differential effects of base-pair mismatch on intrachromosomal versus extrachromosomal recombination in mouse cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:5340-5344.
45. Weintraub, H., P. F. Cheng, and K. Conrad. 1986. Expression of transfected DNA depends on DNA topology. *Cell* **46**:115-122.
46. Wu, H. Y., S. Shyy, J. C. Wang, and L. F. Liu. 1988. Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell* **53**:433-440.